

Estudo da influência das aguardentes na qualidade do Vinho do Porto.

Interação entre os compostos fenólicos do vinho e os aldeídos das aguardentes.

Rita Maria Mateus da Cruz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientadores: Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva

Tiago Alexandre dos Santos Soares de Bellegarde Machado

Jurí:

Presidente: Doutor Carlos Manuel Antunes Lopes, Professor Associado com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Sara Maria de Almeida Lopes Canas, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Professor Doutor Jorge Ricardo da Silva por ter aceite a minha proposta de abordarmos um tema sobre Vinho do Porto, por me ter orientado ao longo deste trabalho e por toda a dedicação e disponibilidade que sempre mostrou.

Ao Engenheiro Tiago Machado e à empresa The Fladgate Partnership – Vinhos, S. A. por terem fornecido todas as amostras de Vinho do Porto e de Aguardentes bem como toda a informação necessária para a realização deste estudo e também toda a disponibilidade ao longo deste trabalho.

À Diana Faria, ao Daniel Duarte e à Juliane Oliveira por toda a ajuda na parte laboratorial e por toda a amizade um grande obrigada.

Ao Instituto Superior de Agronomia de Lisboa e a todos os professores por todos os ensinamentos que me transmitiram.

À Mariana, Ana Lúcia, Carla e Mafalda por toda a compreensão e por toda a amizade ao longo destes anos. À Nela, Ana e Pedro por fazerem parte da minha vida. Ao meu irmão António, obrigada por tudo.

À minha tia Aurea, por toda a ajuda incansável desde sempre e ao longo deste trabalho.

À família Búzio, obrigada!

Queria dar um agradecimento especial e dedicar este trabalho aos meus pais, Dina e Vítor, por todo o apoio e amor que me dedicam sempre. Esta conquista como todas as outras, é vossa também!

Resumo

Para a obtenção de Vinho do Porto é necessário que durante o seu processo de produção a fermentação alcoólica seja interrompida pela adição de aguardente vínica numa quantidade aproximada de cerca de 20% do volume total de vinho. Por isso tem sido cada vez mais importante tentar perceber a forma como a aguardente influencia a qualidade do produto final. Para este trabalho utilizou-se vinhos das colheitas de 2015 e 2016 e cinco aguardentes comerciais com o fundamento de tentar perceber a forma como os aldeídos das aguardentes interagem com os compostos fenólicos dos mostos.

As aguardentes foram caracterizadas quanto ao teor total de acetaldeído bem como a determinação do seu Índice de Reatividade (potencial reativo na presença de unidades de flavana 3-ol). Os resultados demonstraram que as aguardentes utilizadas em 2015 e 2016 são significativamente diferentes entre si.

Os vinhos generosos foram analisados quanto à sua composição em compostos fenólicos sendo avaliados vários parâmetros, nomeadamente intensidade e tonalidade da cor, antocianinas totais e coradas bem como identificação das antocianinas monoglucósidas, poder tanante, procianidinas de baixo peso molecular, índice de ionização, pigmentos totais e polimerizados, índice de polimerização, fenóis totais, fenóis não-flavonóides e fenóis flavonóides e foram também analisados sensorialmente (sabor e aroma).

As maiores diferenças registadas foram ao nível da intensidade e tonalidade da cor, antocianinas totais e coradas, índice de ionização e índice de polimerização, fenóis, poder tanante e antocianinas monoglucósidas enquanto que os outros parâmetros se mantiveram homogéneos.

Palavras-chave: Vinho do Porto, compostos fenólicos, aldeídos, aguardente, qualidade

Abstract

To obtain Port Wine is necessary that during its production process, the alcoholic fermentation is stopped by the addition of wine spirits in an approximate quantity of about 20% of the total volume of wine. So it has been increasingly important to try to understand how the spirits influence the quality of the final product. For this work we used wines of 2015 and 2016 harvest and five commercial spirits with the objective of trying to figure out how the aldehydes of spirits interact with the phenolic compounds of the must.

The spirits have been identified as the total strength of the acetaldehyde as well as determining its Reactivity Index (reactive potential in presence of flavan-3-ol units). The results demonstrated that the spirits used in 2015 and 2016 are significantly different from each other.

The Port wines were analyzed as to its composition in phenolic compounds, being evaluated various parameters, including color intensity and hue, total anthocyanins and stained as well as identification of anthocyanins monoglucosides, tannin power, procyanidin of low molecular weight, ionization index, total pigments and polymerised, polymerization index, total phenols, flavanoids and non-flavonoids phenols were also evaluated sensorially (taste and smell).

The greatest differences were observed in color intensity and hue, total anthocyanins and stained, ionization index and polymerization index, phenols, tannin power and anthocyanins monoglucosides, while the other parameters remained homogeneous.

Keywords: Port wine, phenolic compounds, aldehyde, wine spirit, quality

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract.....	IV
Índice.....	V
Índice de Figuras.....	VII
Índice de Quadros	VIII
Lista de abreviaturas	IX
I. Breve introdução	11
II. Revisão bibliográfica.....	12
1. Composição fenólica dos vinhos	12
1.1. Compostos fenólicos de natureza não flavonóide	13
1.2. Compostos fenólicos de natureza flavonóide.....	14
2. Composição química das aguardentes.....	22
3. O Vinho do Porto e a aguardente como parte integrante do processo de fabrico	
25	
3.1. Breve história.....	25
3.2. O processo de produção do Vinho do Porto e a importância da aguardente	28
3.3. Estilos de Vinho do Porto.....	34
III. Descrição e objectivos do trabalho.....	36
IV. Material e métodos	37
1. Uvas utilizadas e processo de vinificação dos vinhos generosos.....	37
2. Análises Físico-químicas dos vinhos generosos	38
2.1. Características cromáticas e composição fenólica.....	38
2.2. Análise de taninos condensados	41
3. Determinação do potencial reativo das aguardentes (I. R. – índice de reatividade)	47
3.1. Princípio do método	48
3.2. Procedimento experimental	48
4. Análise sensorial	49

4.1. Vinhos generosos.....	49
4.2. Análise sensorial das Aguardentes	50
5. Tratamento estatístico	50
V. Resultados e discussão.....	51
1. Identificação das aguardentes, composição em aldeídos e IR.....	51
1.1. Identificação das aguardentes em estudo e respectiva composição em aldeídos.....	51
1.2. Determinação do potencial reativo das aguardentes (IR – Índice de Reatividade)	53
2. Caracterização analítica dos vinhos da colheita de 2016.....	55
3. Análise individualizada dos 3-flavanóis	55
4. Análise individualizada das antocianinas monoglucósidas	58
5. Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015 e 2016.....	60
5.1. Vinhos generosos da colheita de 2015.....	60
5.2. Vinhos generosos da colheita de 2016 e comparação com a colheita de 2015.....	62
6. Caracterização sensorial dos vinhos generosos e das aguardentes vínicas.....	68
6.1. Análise sensorial das aguardentes.....	68
6.2. Análise sensorial dos vinhos generosos da colheita de 2016.....	69
VI. Conclusão	70
Referências Bibliografia.....	71
Anexos.....	80

Índice de Figuras

Figura 1: Fórmula da estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos	13
Figura 2: Fórmula de estrutura da flavona, precursora dos compostos flavonóides	14
Figura 3: Fórmula da estrutura química dos flavonóis existentes na uva	15
Figura 4: Fórmula da estrutura química das catequinas e das galhocatequinas	16
Figura 5: Estrutura das procianidinas do tipo B	17
Figura 6: Estrutura de uma das procianidinas do tipo A, neste caso a A2	17
Figura 7: Estrutura genérica das proantocianidinas condensadas	18
Figura n.º 8: Estrutura das principais antocianidinas presentes	19
Figura 9: Caracterização do processo de produção do Vinho do Porto	33
Figura 10: Diferentes categorias de Vinho do Porto	34
Figura 11 - Resumo esquemático do método descrito por Sun et al., (1998a)	44
Figura 12 – Esquema das duas etapas que envolvem o método I. R.	48
Figura 13 – Cromatograma de HPLC registado a 280 nm da fracção de 3-flavanóis monoméricos de uma das amostras	56
Figura 14 – Cromatograma de HPLC registado a 280 nm da fracção de 3-flavanóis oligoméricos de uma das amostras (procianidinas)	56
Figura 15 - Cromatograma de HPLC registado a 520 nm da fracção de antocianinas monoglucósidas de uma das amostras	58

Índice de Quadros

Quadro 1 - Parâmetros analisados na análise sensorial das aguardentes	50
Quadro 2 – Concentração do acetaldeído das aguardentes comerciais utilizadas em 2015 e 2016.	52
Quadro 3 – Índice de Reatividade das aguardentes utilizadas na colheita de 2015 e na colheita de 2016.....	54
Quadro 4 – Caracterização analítica dos vinhos generosos da colheita de 2016.....	55
Quadro 5 – Resultados da quantificação dos 3-flavanóis monoméricos e oligoméricos por HPLC e quantificação total dos mesmos	57
Quadro 6 - Resultados da quantificação das antocianinas monoglucósidas por HPLC.....	59
Quadro 7 – Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015	61
Quadro 8 – Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2016	63
Quadro 9 – Comparação da cor, pigmentos e dos compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015 e da colheita de 2016	67
Quadro 10 – Resultados da análise sensorial das cinco aguardentes em estudo	68
Quadro 11 – Resultado da prova triangular dos vinhos generosos da colheita de 2016	69
Quadro 12 – Resultado da prova de preferência dos vinhos generosos da colheita de 2016	69

Lista de abreviaturas

A_{280} – Absorvância ao comprimento de onda de 280 nm

A_{420} – Absorvância ao comprimento de onda de 420 nm

A_{520} – Absorvância ao comprimento de onda de 520 nm

A_{620} – Absorvância ao comprimento de onda de 620 nm

AC – Acetaldeído

ASB – Albumina Sérica Bovina

BT – Butanal

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (High Performance Liquid Chromatography)

IC – Intensidade da Cor

IPAC – Instituto Português de Acreditação

IVDP – Instituto dos Vinhos do Douro e Porto

MIVDP – Método Interno

ND – não detetado

NTU – Unidades de Turbidez (*Nephelometric Turbidity Units*)

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho (International Organisation of Vine and Wine)

P - Propanal

TC – Tonalidade da Cor

TFP – The Fladgate Partnership – Vinhos, S. A.

u.a. – unidades de absorvância

Uv-Vis – Ultra-Violeta / Visível

2MB – 2-metilbutanol

3MB – 3-metilbutanol

I. Breve introdução

Sendo um produto universal, o Vinho possui uma complexidade de compostos inerentes à sua matéria-prima, a uva e ao processo de produção, fermentação, estabilização e envelhecimento. O Vinho do Porto é um produto genuíno produzido na Região Demarcada do Douro em que o seu processo de produção sofre algumas alterações comparativamente com o vinho de consumo. Na vinificação do Vinho do Porto, a fermentação alcoólica é interrompida, quando aproximadamente metade dos açúcares foram metabolizados, pela adição de aguardente que representa cerca de 20% do volume final.

Assim, o Vinho do Porto tem uma complexidade acrescida, inerente aos compostos químicos que existem nas aguardentes e que vão interagir com os compostos existentes no mosto e no mosto.

O vinho é maioritariamente composto por: água, etanol, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e glicerol. Por outro lado a aguardente é constituída por três principais grupos de compostos, álcoois superiores, ésteres e aldeídos (Rogerson & De Freitas, 2002) e a sua concentração vai depender não só do processo de destilação como da qualidade do produto destilado, (Pissarra *et al.*, 2005). Estes compostos têm efeitos diretos nas propriedades sensoriais do produto final e efeitos secundários no processo de envelhecimento do mesmo, (Reader & Dominguez, 2003).

II. Revisão bibliográfica

1. Composição fenólica dos vinhos

O vinho tinto possui uma composição química complexa que, além de água e etanol, contém uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos extraídos das uvas durante o processo de vinificação. Face a esta composição, destaco maior relevância para a componente fenólica não-volátil uma vez que são estes os elementos em estudo nesta dissertação, tanto ao nível da composição do mosto como ao nível da futura interação com a composição da aguardente.

Estes compostos têm vindo a ganhar importância, não só pela sua contribuição para a qualidade dos vinhos, incluindo as propriedades sensoriais (cor, sabor, adstringência e amargor) (Timberlake & Bridle, 1976; Arnold *et al.*, 1980; Haslam, 1980; Sun & Spranger, 2015), mas também pelos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde humana, relacionados com a sua acção protectora contra doenças cardiovasculares e a sua capacidade de captar radicais livres (Masquelier, 1988; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991a; Carando *et al.*, 1999; Spranger *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2010; Sun & Spranger, 2015).

Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas um pouco por todo o lado, com variadíssimas funções como, por exemplo, protecção contra a radiação UV, pigmentação, defesa contra agentes patogénicos (devido às suas propriedades antifúngicas), protecção contra nódulos e servindo como atractivo para os polinizadores (Corradini & Nicoletti, 2013).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas (Diaz-Garcia *et al.*, 2013; Martelo-Vidal & Vásquez, 2014) que estão presentes nas uvas e no vinho em dois grandes grupos, o dos compostos flavonóides e o dos não-flavonóides (Belajova, 2012; Sun & Spranger, 2015). A sua concentração no vinho vai depender de vários factores, desde as castas, o solo, o clima e influências sazonais, às condições de amadurecimento, técnicas de viticultura e processos de vinificação das uvas (Cozzolino *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2013; Martelo-Vidal & Vásquez, 2014) bem como o processo de estabilização e estágio em barrica.

No âmbito da composição fenólica não-volátil existe uma grande diversidade a nível químico, que se deve à grande variedade de castas existente nos dias de hoje, mas também se deve ao facto deste tipo de compostos existirem na forma livre e na forma conjugada, o que permite a sua ligação a moléculas de açúcar, tais como a glucose, a galactose, a sacarose e a manose, para produzir mono-, di-, tri-, ou mesmo tetraglicosídeos (Garrido & Borges, 2013).

1.1. Compostos fenólicos de natureza não flavonóide

Embora não sendo um dos grupos mais relevantes para este estudo, não posso deixar de referir os compostos fenólicos não-flavonóides, que se dividem em ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos), estilbenos e ainda taninos hidrolisáveis, estes últimos formados por uma molécula glucídica ligada ao ácido gálico ou ao ácido elágico (Banquete & Trione, 1998; Sun & Spranger, 2015). Por sua vez, os ácidos fenólicos subdividem-se em ácidos benzóicos, que contêm seis átomos de carbono (C6-C1) e ácidos cinâmicos, com uma cadeia lateral insaturada (C6-C3) (Sun & Spranger, 2015). Podem ocorrer tanto na forma livre como na forma conjugada e existem predominantemente como ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos (Fig. 1) (Garrido & Borges, 2013).

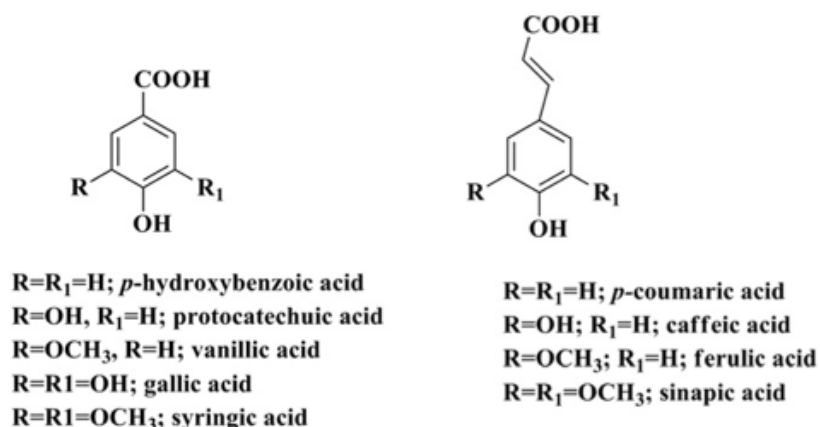


Figura 1: Fórmula da estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos

Extraído de: Garrido & Borges, 2013, p. 1845.

1.2. Compostos fenólicos de natureza flavonóide

Sendo os compostos polifenólicos mais importantes na natureza, os flavonóides apresentam um esqueleto de carbono em C6-C3-C6, no qual dois anéis aromáticos estão ligados por uma cadeia em C3, correspondente a um heterociclo oxigenado (Fig. 2)

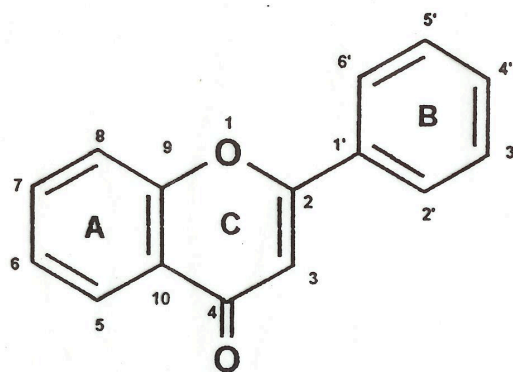


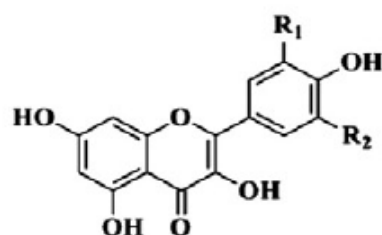
Figura 2: Fórmula de estrutura da flavona, precursora dos compostos flavonóides

Existem diferentes estruturas de flavonóides, que variam consoante o grau de oxidação do heterociclo. Assim, as principais famílias, relevantes para este trabalho, são as antocianinas, os flavonóis e 3-flavanóis.

1.2.1. Os flavonóis

Estes compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxilo na posição 3 (Sun & Spranger, 2015) tendo sido identificadas as formas agliconas (não glicosadas) mais importantes: quercetina, quempferol, miricetina e isoramnetina (Fig. 3).

A reactividade entre os pigmentos e o seu cofactor de copimentação (também designados de copigmentos por alguns autores) envolve as antocianinas glucosídicas e alguns ácidos fenólicos, flavonóides e em particular envolve os derivados dos flavonóis e o subgrupo da flavona, (Boulton, 2001).



R₁=OH; R₂=H Quercetin (Flavonol)
R₁=H; R₂=H Kaempferol
R₁=OCH₃; R₂=H Isorhamnetin
R₁=OH; R₂=OH Myricetin
R₁=OCH₃; R₂=OH Laricitrin
R₁=R₂=OCH₃ Syringetin

Figura 3: Fórmula da estrutura química dos flavonóis existentes na uva

Extraído de: Garrido & Borges, 2013, p. 1847.

1.2.2. Os taninos condensados (proantocianidinas ou 3-flavanóis)

Os taninos existentes no reino vegetal subdividem-se em dois grupos: os taninos hidrolisáveis, provenientes da madeira, que só aparecem no vinho depois deste ter passado por um estágio em barrica; e os taninos condensados. Estes últimos são próprios das uvas, ou seja, são monómeros, oligómeros e polímeros derivados estruturalmente do 3-flavanóis, formando assim as proantocianidinas.

Sendo compostos com grande importância em enologia, as suas propriedades físico-químicas têm sido alvo de vários estudos uma vez que se sabe que são as principais substâncias responsáveis por algumas características sensoriais do vinho (cor, sabor, adstringência e amargor). Outro aspecto a ter em consideração é o facto de as proantocianidinas terem um papel fundamental no processo de envelhecimento dos vinhos, nomeadamente no que incide sobre as suas capacidades de oxidação, condensação e polimerização.

As proantocianidinas estão presentes na uva sob a forma de 3-flavanóis monoméricos, oligoméricos e poliméricos, (Cheynier *et al.*, 1998). A maneira de distinguirmos os diferentes compostos deste grupo é através da estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel pirânico C (C2 e C3) e do grau de hidroxilação dos anéis A e B. As catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) encontram-se hidroxiladas nas posições 3' e 4' do anel B, as galhocatequinas ((+)-galhocatequina e (-)-epigalhocatequina) encontram-se hidroxiladas nas posições 3', 4' e 5' do anel B (Fig. 4), enquanto que todos os 3-flavanóis monoméricos encontram-se hidroxilados nas posições 5' e 7' do anel A, (Porter, 1988).

As proantocianidinas (oligómeros e polímeros de 3-flavanóis) compreendem vários tipos de moléculas, das quais as procianidinas que são polímeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina e as prodelfinidinas que são constituídas por (+)-galhocatequina e (-)-epigalhocatequina (Porter, 1988).

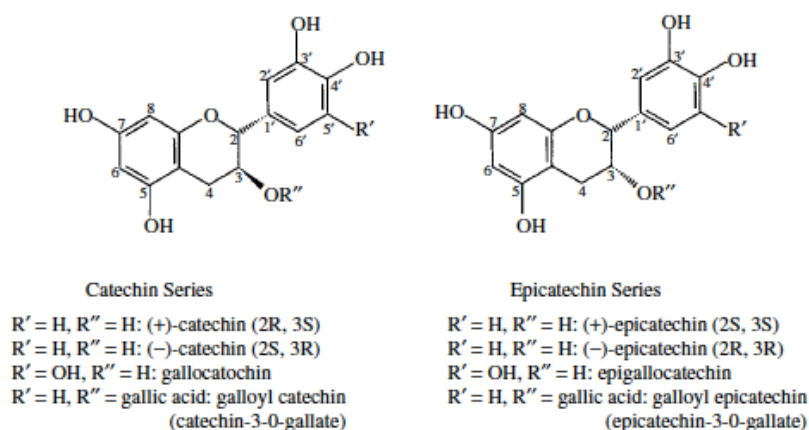


Figura 4: Fórmula da estrutura química das catequinas e das galhocatequinas

Extraído de: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006, p. 149.

O tipo de ligação interflavanólica, o grau de polimerização e o grau de esterificação do ácido gálico vão produzir uma grande diversidade estrutural destes compostos (Fig. 7) (Carvalho, 2005).

Por isso, as procianidinas do tipo B são dímeros que resultam da condensação de duas unidades de 3-flavanóis unidas por ligações C4-C8 ou, em menor quantidade por ligações C4-C6 (Fig. 5) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

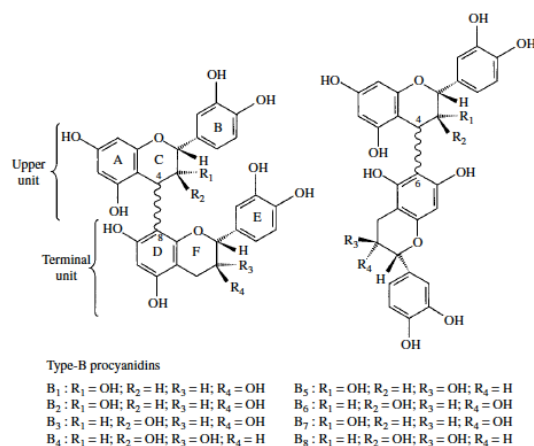


Figura 5: Estrutura das procianidinas do tipo B

Extraído de: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006, p. 150.

Por outro lado, as procianidinas do tipo A são também dímeros que, para além das ligações C4-C8 ou C4-C6, têm uma ligação suplementar do tipo éter, entre os oxigénios de C5 ou C7 da unidade terminal e de C2 da unidade superior (Fig. 6) (Sun & Spranger, 2015). As procianidinas triméricas dividem-se em tipo C, cujas ligações interflavanólicas são do tipo B, e procianidinas triméricas do tipo D, cujas ligações são do tipo B e do tipo A (Carvalho, 2005).

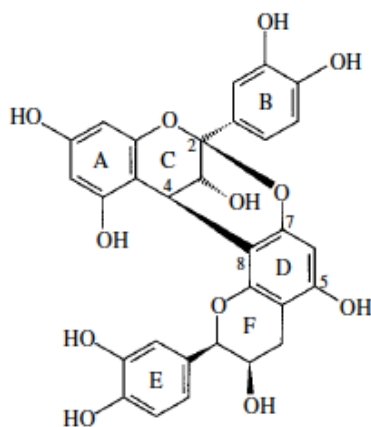


Figura 6: Estrutura de uma das procianidinas do tipo A, neste caso a A2

Extraído de: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006, p. 151.

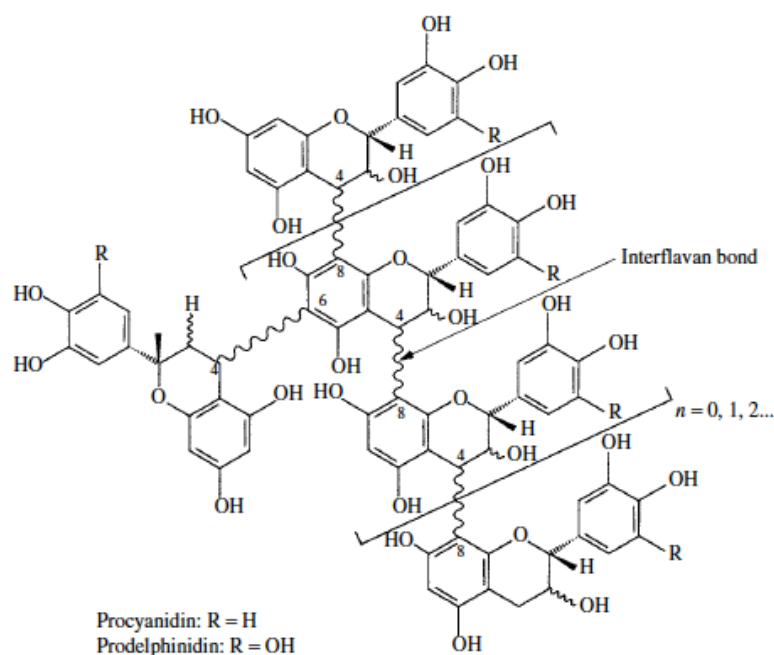


Figura 7: Estrutura genérica das proantocianidinas condensadas

Extraído de: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006, p. 151.

Segundo vários autores, as proantocianidinas ou taninos condensados localizam-se principalmente nas partes sólidas do cacho de uva. Por sua vez, nas grainhas encontramos unicamente procianidinas, enquanto que na película e no engaço estão também presentes prodelfinidinas. Principalmente nas castas tintoreiras existe uma grande concentração destes compostos nas polpas das uvas. Estes compostos são ainda, por definição, substâncias capazes de produzir combinações estáveis com as proteínas ou com outros polímeros como os polissacáridos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Esta interacção tanino-proteína, está inteiramente relacionada com as propriedades sensoriais do vinho e com problemas de sua estabilização, nomeadamente ao nível da clarificação. Desta forma, os taninos quando entram em contacto com as proteínas salivares, despertam uma sensação de secura na cavidade bucal, designada por adstringência (Sun & Spranger, 2015). Com uma vertente mais prática, as proteínas permitem a clarificação dos vinhos, espontânea ou por colagem com proteínas (Cheynier *et al.*, 1998; Sun & Spranger, 2015).

1.2.3. As antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais, responsáveis por uma panóplia de cores do reino vegetal, desde o laranja ao azul/violeta. Sendo uma fracção importante dos flavonóides, as antocianinas acumulam-se nas folhas durante a fase de senescência e são responsáveis pela coloração das películas das uvas tintas e no caso das castas tintureiras chega mesmo a haver coloração das polpas.

Dentro dos pigmentos antociânicos temos as antocianinas que correspondem a glucósidos do catião flavílio polihidroxilados ou metoxilados e temos as antocianidinas que são formas não glucosiladas que diferem entre si pelo número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis A e B.

Esta componente glucosídica vai permitir um aumento da estabilidade química e um aumento da solubilidade em água das antocianinas (Jackson, 2000). No género *Vitis* podemos encontrar cinco principais estruturas das antocianinas: a delphinidina, a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina (Fig. 8), que são muitos mais estáveis na forma glucosídica (antocianinas) do que na forma aglicona (antocianidinas) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esta classificação é feita primeiramente com base na posição dos grupos hidroxilo e metoxilo no anel B da molécula antocianina (Jackson, 2000), ou seja, as estruturas das antocianinas diferem entre si pela natureza, número e posição das moléculas de açúcar ligadas à aglicona (Carvalho, 2005), assim como pela presença e natureza do ácido esterificado no fragmento de açúcar (Sun & Spranger, 2015).

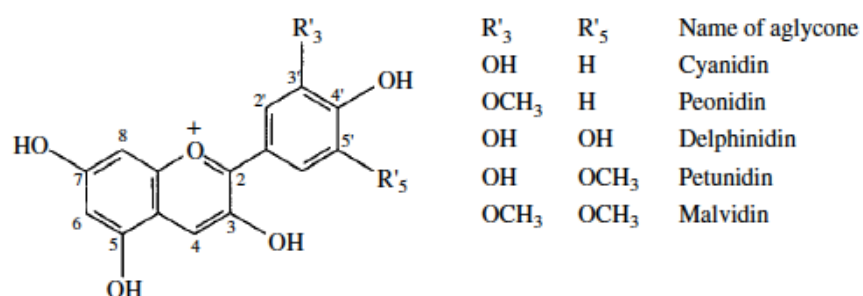


Figura n.º 8: Estrutura das principais antocianidinas presentes na espécie *Vitis vinífera*

Extraído de: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006, p. 145.

Recentemente foi identificada mais uma estrutura de antocianina, a pelargonidina (Castillo-Munoz *et al.*, 2009) que também sofre reações de esterificação (pelargonidina-3-O-glucosido, pelargonidina-3-O-acetilglucosido e pelargonidina-3-O-*p*-cumarilglucosido).

Na espécie *Vitis vinífera*, as moléculas de açúcar encontram-se ligadas às antocianinas na posição 3 (Sun & Spranger, 2015) e há a presença maioritária do pigmento malvidina-3-O-glucosido e dos seus derivados acilados (Carvalho, 2005). Sendo a glucose o monossacárido mais frequente, é estabelecida a ligação entre o grupo hidroxilo da posição 1 com o carbono da posição 3 da antocianidina (Sun & Spranger, 2015).

Estes monossacáridos podem ainda encontrar-se na forma livre ou na forma esterificada, nesta ultima situação as moléculas das antocianinas designam-se por aciladas e a reacção de esterificação dá-se na posição 6 e é feita por intermédio do ácido acético, do ácido *p*-cumárico e do ácido cafeíco (Carvalho, 2005; Sun & Spranger, 2015).

A proporção dos pigmentos antociânicos vai influenciar a estabilidade da cor e da cromatocidade, uma vez que ambas as propriedades são afectadas pelo tipo e grau de hidroxilação do anel B da antocianina (Jackson, 2000). Isto é, quanto maior o grau de hidroxilação também maior será o efeito batocrómico (passagem da cor vermelha para a cor violeta), enquanto que a metilação do grupo hidroxilo vai induzir o efeito contrário (intensificação da cor vermelha) (Jackson, 2000; Carvalho, 2005).

Por outro lado, as características cromáticas das uvas e dos vinhos não são exclusivamente determinadas pelo tipo de pigmento formado, pois sofrem ainda influência das condições do meio, tais como o pH e o SO₂, e do efeito de copigmentação. É durante a fermentação e especialmente nos dois primeiros anos de maturação do vinho, que as antocianinas monoméricas sofrem uma grande variedade de reacções e associações e são formados novos pigmentos derivados (copigmentação) das antocianinas, cruciais para a estabilização da matéria corante, (He *et al.*, 2012).

No caso do pH do meio aquoso, este faz oscilar a coloração das antocianinas uma vez que faz com que a sua estrutura varie em equilíbrio na solução, implicando reacções de transferência de protões, de hidratação e de isomeria (Carvalho, 2005).

Para um meio ácido ou neutro, existem em equilíbrio quatro estruturas diferentes para cada antocianina monomérica: catião flavílio (vermelho), base quinonoidal (azul/violeta), pseudo-base carbinol (incolor) e chalcona (incolor) (Monagas & Bartolomé, 2009). Desta

forma, um pH baixo vai aumentar a concentração de antocianinas no estado de catião flavílio fazendo realçar a sua cor vermelha e retarda a hidrólise das moléculas antociânicas respectivamente na libertação do açúcar e na parte fenólica. Por outro lado, um aumento de pH vai fazer decrescer a intensidade da cor e a proporção de antocianinas no estado de catião flavílio (Jackson, 2008).

Contudo, a quantidade de dióxido de enxofre livre existente na solução também é um factor muito importante que condiciona a intensidade da cor dos vinhos, uma vez que tem a capacidade de ser um agente eficaz de branqueamento das antocianinas, embora reversível (Jackson, 2000).

O fenómeno da copigmentação tem sido alvo de vários estudos com o objectivo de se tentar perceber a relação entre os constituintes da uva e a cor do vinho, fenómeno que ocorre no vinho durante o processo de vinificação e envelhecimento com vista a intensificar a cor e estabilizar os pigmentos (Carvalho, 2005).

Assim é possível afirmar que existem dois tipos de copigmentações: a copigmentação intramolecular e a copigmentação intermolecular entre as antocianinas e outros compostos.

A copigmentação intramolecular é restrita a antocianinas aciladas em que as antocianinas e os copigmentos estão ligados por ligações covalentes ao mesmo resíduo de açúcar, através de ligações hidrofóbicas fortes que garantem uma melhor estabilização da cor do que a copigmentação intermolecular devido à força das ligações (Brouillard, 1983).

A copigmentação intermolecular consiste numa interação molecular por ligações fracas de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas, não coradas que actuam como copigmentos (Brouillard, 1983), como por exemplo os flavanóides (essencialmente os 3-flavanóis) os ácidos fenólicos e os derivados dos flavonóides, (Boulton, 2001).

Desta forma, foi possível concluir que a copigmentação é o resultado de interações hidrofóbicas entre a antocianina (catião flavílio e base quinonoidal) e outras moléculas não coradas que actuam como copigmentos (Monagas & Bartolomé, 2009), como sejam as catequinas e as proantocianidinas (Carvalho, 2005).

Estes compostos começam a polimerizar com as antocianinas livres e o caso específico da interação antocianina-proantocianidina ajuda a minimizar a precipitação dos taninos (Jackson, 2000). Este processo de polimerização vai permitir a estabilização da cor do vinho uma vez que protege as moléculas antociânicas da oxidação ou de outras modificações químicas, fazendo com que as antocianinas sejam mais resistentes às descolorações provocadas pelo SO₂ e por um pH alto (Jackson, 2000). A maioria das

antocianinas ao combinar-se e condensar-se com taninos vai dar origem a moléculas de cor mais estável (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A polimerização aumenta a proporção tanto da forma química do catião flavílio como da forma da base quinonoidal, o que nos remete para a importância de haver um pH favorável para o aspecto brilhante do vinho tinto (Jackson, 2000). Contudo, a polimerização juntamente com a oxidação fazem mudar a tonalidade das antocianinas para um amarelo acastanhado, não necessitando assim a copigmentação da presença de oxigénio; mas é favorecida quando as antocianinas se encontram no estado de catião flavílio com baixos valores de pH (Jackson, 2000). Durante o armanezamento/envelhecimento, a copigmentação de antocianinas diminui e a polimerização aumenta, dando origem a modificações das características da cor do vinho (Bimpilas *et al.*, 2016).

No caso do Vinho do Porto, a importância da copigmentação é reduzida devido à elevada concentração de álcool e de acetaldeído, derivada da adição de aguardente durante o processo (Jackson, 2000). A presença de etanol vai agir em sentido contrário (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006); e a presença de acetaldeído faz diminuir a concentração de antocianinas e de outros compostos fenólicos envolvidos nas reacções químicas, o que vai provocar na primeira fase do processo um aumento da tonalidade de vermelho para vermelho-azulado. Numa segunda fase do processo, estes pigmentos vão conduzir à formação de novos pigmentos mais estáveis com uma tonalidade vermelho-tijolo (Carvalho, 2005).

2. Composição química das aguardentes

Uma vez que a produção de Vinho do Porto assenta na adição de aguardente ao mosto numa fase específica da fermentação, é muito importante conhecer os seus constituintes no sentido de tentar entender qual a sua influência sobre a composição fenólica do vinho. Assim, é de salientar a importância dos aldeídos, dos álcoois superiores e dos esteres etílicos derivados de ácidos gordos.

Vários autores defendem que o acetaldeído, um dos aldeídos mais abundantes nas aguardentes, induz à polimerização dos taninos e à reacção entre os 3-flavanóis e as antocianinas, (Jurd & Somers, 1970; Somers, 1971; Timberlake & Bridle, 1976; Rivas-

Gonzalo et al., 1995; Pissarra et al., 2003). Este fenómeno conduz à formação de novos pigmentos estruturalmente mais estáveis com uma matriz vermelha-acastanhada (Mateus et al., 2002) que contribuem para uma gradual mudança de cor do vermelho intenso para o vermelho-acastanhado durante a fase de armazenamento e envelhecimento, ou seja, há um aumento da intensidade da cor e uma passagem de tons vermelhos para tons acastanhados, (Timberlake & Bridle, 1976; Roggero et al., 1987; Rivas-Gonzalo et al., 1995; Dallas et al., 1996; Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Mateus et al., 2002).

Pissarra et al., 2005 defendem que aguardentes com maiores teores de aldeídos e Índice de Reatividade, induzem maiores alterações colorimétricas ao nível da cromaticidade, tonalidade e luminosidade do Vinho do Porto, ou seja, os aldeídos presentes nas aguardentes estão correlacionados com a diminuição da luminosidade do vinho devido ao desvio para uma cor mais amarelada, com o deslocamento do ângulo da matriz para valores mais altos que resulta no aparecimento de tonalidades amareladas e com o aumento da saturação da cor dos vinhos.

Os aldeídos são compostos carbonilados, juntamente com as cetonas, que se distinguem entre si através da localização do grupo funcional carbonilo na molécula, (Jackson, 2000). Estes compostos têm um elevado impacto olfactivo com baixo limiar de percepção, e se forem encontrados em doses muito elevadas podem conduzir ao aparecimento de odores desagradáveis como, por exemplo, maçã verde, folhas verdes, fruta madura e até mesmo travesal amargo (Carvalho, 2005). São ainda compostos-chave nas reacções bioquímicas que levam à síntese de álcoois superiores por meio de aminoácidos ou pelo meio alternativo, através dos açúcares, (Barros & Curvelo-Garcia, 2015).

De entre os aldeídos presentes nos vinhos e aguardentes (propanal, acetaldeído, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2-metilpropanal, benzaldeído e metilglioxal), o acetaldeído é de facto o aldeído presente em maior quantidade, que desempenha um papel importante na estabilização da cor dos vinhos tintos durante o envelhecimento uma vez que facilita a polimerização dos fenóis (antocianinas e catequinas) (Ribéreau-Gayon et al., 2006) e contribui ainda para a expressão aromática (Jackson, 2008). Este composto é formado durante a fermentação alcoólica, aquando da degradação de açúcares por parte das leveduras (Carvalho, 2005), pode ainda ser formado como sendo um composto intermédio da degradação do piruvato (Christoph & Bauer-Christoph, 2007; Barros & Curvelo-Garcia, 2015) e, se as temperaturas forem baixas, combina-se facilmente com o dióxido de enxofre (Ribéreau-Gayon et al., 2006). É encontrado nas aguardentes devido à sua volatilidade se o título alcoométrico não ultrapassar os 77% expressos em volume, de modo a conservar o máximo de aldeídos possíveis (Guimarães, 2014).

Para a produção de Vinho do Porto é necessário que a fermentação seja interrompida a meio, numa fase em que a produção natural de aldeídos é ainda escassa, sendo os aldeídos veiculados pelo destilado que vão colmatar essa lacuna (Guimarães, 2014). Assim, as aguardentes devem ser limpas mas não completamente neutras no que diz respeito aos níveis de aldeídos e esteres. Contudo, não podem ser demasiado agressivas ou dominantes (Guimarães, 2014), para que sejam mantidas as características do vinho.

Os álcoois superiores constituem a principal fracção do não-álcool e não devem estar em excesso nas aguardentes pois conduzem a uma depreciação da qualidade sensorial, com um aroma fortemente pungente e odor e sabor a queimado. Em contrapartida, quando os níveis destes compostos são ideais provocam um carácter frutado (Barros & Curvelo-Garcia, 2015).

Por último, os ésteres constituem o grupo de compostos que contribuem para o aroma dos destilados, com influência positiva na produção de Vinho do Porto pois a maior parte está associada a aromas agradáveis frutados e florais, se as suas concentrações não forem em excesso (Barros & Curvelo-Garcia, 2015). Aguardentes ricas em ésteres vão contribuir para o perfil aromático e frutado do Vinho do Porto (Guimarães, 2014).

3. O Vinho do Porto e a aguardente como parte integrante do processo de fabrico

3.1. Breve história

O Vinho do Porto é um produto tipicamente português, que está inserido na categoria dos vinhos fortificados, ou seja, o seu elevado teor de álcool e o seu elevado teor de açúcar são aspectos que o caracterizam.

Desde a segunda metade do século XV que era exportada, para Inglaterra, uma quantidade significativa de vinho português, exportação que se foi mantendo segundo as vicissitudes políticas e económicas europeias. Nessa época, o principal porto de embarque localizava-se em Viana do Castelo, mas com vista a “desenvolver o seu negócio de vinhos do Douro, os mercadores de Viana do Castelo tinham, portanto, de se estabelecer no Porto e no final da primeira década do século XVIII a maioria deles já o tinha feito. Um dos pioneiros do comércio de vinhos do Douro foi Peter Bearsley, filho do fundador da Taylor's, que se diz ter sido o primeiro comerciante inglês de vinho a fazer a perigosa e desconfortável viagem para além do Marão, em busca do melhor vinho” (*História do Vinho do Porto...*, 2013).

Oriundo da Região Demarcada do Douro, a sua história leva-nos até ao ano de 1678, ano em que se deu o embarque das primeiras pipas na cidade do Porto, actividade que deu origem ao nome de “Vinho do Porto”. “Às vezes, para o proteger durante a longa viagem por mar, o vinho era “fortificado” com a adição antes do embarque de uma pequena quantidade de aguardente vínica, a qual aumentava a sua força alcoólica e o impedia de se estragar” (*História do Vinho do Porto...*, 2013).

Mais tarde, no início do século XVIII, com o bloqueio europeu ao comércio inglês, a assinatura do Tratado de Methuen entre Inglaterra e Portugal (1703) estabeleceu que os vinhos portugueses exportados para Inglaterra ficassem a pagar um terço a menos de imposto do que os vinhos franceses. Foram então criadas condições para o desenvolvimento do negócio do Vinho do Porto, o qual foi exportado para Inglaterra em grande escala, e daí se propagou para todo o mundo. Contudo, o rápido crescimento da procura deu origem a frequentes especulações no comércio e a práticas fraudulentas,

“como a adição da baga de sabugueiro aos vinhos mais pobres para lhes dar cor e a ilusão de qualidade” (*História do Vinho do Porto...*, 2013).

Outras complicações surgiram na década de 1750, quando se registou uma queda acentuada na procura do Vinho do Porto e um excesso de produção no Douro. Em 1756, seguindo a sua política económica monopolista, o Marquês de Pombal determinou o controlo estatal sobre o comércio do Vinho do Porto, por meio de uma empresa, a Companhia Geral da Agricultura das Vinhas do Alto Douro (mais tarde conhecida como a Real Companhia ou Companhia Velha), com o monopólio do comércio com a Inglaterra e o Brasil e da produção e venda de aguardente no Norte de Portugal. Além de possibilitar a regeneração do crédito do nosso vinho, que estava a ser tão depreciado pelo comércio inglês, aquela decisão pombalina permitiu ainda que as vinhas do Douro se tornassem na primeira área vitivinícola no mundo a ser legalmente demarcada com pilares de pedra, conhecidos como os “marcos pombalinos” (Garcia, 1891).

“Ao estabelecer os limites geográficos das vinhas do Vinho do Porto, classificando-as de acordo com a qualidade e estabelecendo normas para a produção do vinho, o Marquês de Pombal foi um precursor visionário do moderno conceito de DOC (Denominação de Origem Controlada)” *História do Vinho do Porto...*, 2013).

Na opinião de alguns historiadores, com as medidas pombalinas toda a segunda metade do século XVIII constituiu um período importante na história do Vinho do Porto, considerando-se a acção da Companhia “profunda e eficaz na defesa do vinho do Porto, embora não tivesse feito subir muito a sua exportação” (Macedo, 1965, pp. 643-644). Ao mesmo tempo, ainda que se tenham registado grandes oposições, teve lugar o início de um conjunto de práticas tendentes a uma melhor fortificação do vinho, a qual na década de 1840 era já muito comum e que se estendeu pelo século XIX, transformando o Vinho do Porto no importante vinho fortificado actualmente existente. Foi a partir da década de 1860 que se inverteu a tendência depressiva de que vinha sofrendo o seu comércio, recuperando progressivamente este sector que, até à II Guerra Mundial conheceu um novo período de expansão (Martins, 1988).

Por outro lado, o “comércio do vinho do Porto fez do Douro uma região de monocultura e de economia de mercado, totalmente dependente do exterior (das exportações e dos agentes comerciais). A vida das populações durienses passou a estar fortemente condicionada pela produção e comercialização do vinho do Porto e a economia regional

subordinada a um único produto, o vinho, com uma única saída, a exportação” (Martins, 1988, p. 392).

Hoje em dia, é um dos vinhos mais conceituados internacionalmente devido à sua grande complexidade aromática e variedade de estilos, fruto da acidentada zona montanhosa do Alto Douro, a nordeste de Portugal, que, através de uma associação única do clima, da posição do terreno, do solo composto de xisto, das castas e das tradições, é possível obter vinhos singulares, de grande intensidade aromática apreciados pelo mundo inteiro. Esta região está dividida em três sub-regiões, Baixo Corgo, Cima Corgo e Douro Superior, naturalmente distintas, não só por factores climáticos como também sócio-económicos.

Outro elemento importante no processo de unificação do Vinho do Porto reside no facto de serem feitos *blends* (lotes) tanto de uvas como de vinhos, em várias fases da produção, o que torna este aspecto particularmente importante para a produção daquele vinho (Hogg, 2013).

3.2. O processo de produção do Vinho do Porto e a importância da aguardente

O Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP) define vinho fortificado como um vinho especial com um teor alcoólico compreendido geralmente entre os 15 e os 22% v/v numa gama alargada de cores e de doçuras tanto para o Vinho do Porto branco como para o Vinho do Porto tinto.

As castas, perfeitamente adaptadas ao clima da região, são vindimadas manualmente para dentro de pequenas caixas (aproximadamente 25kg), quando atingem um estado de maturação avançado a fim de garantir uma elevada concentração de açúcares e de compostos fenólicos e baixa acidez nos bagos (Carvalho, 2005). O tempo exacto em que as uvas são vindimadas é determinado pela densidade relativa do mosto entre 1,090 e 1,100, acidez total entre os 0,39 e 0,60g/100ml expressos em ácido tartárico, pH entre os 3.3 e os 3.7 podendo atingir 4.0 em zonas mais quentes e uma concentração em compostos fenólicos entre 0.4 e 0.6g/L, (Clarke & Bakker, 2004). Das inúmeras castas existentes, os *ex-líbris* são Touriga Nacional, Touriga Franca, Tinta Amarela, Tinta Barroca, Tinta Roriz e Tinto Cão.

Devido à topografia montanhosa da região, estas castas têm que ser plantadas separadamente em “patamares”, construídos nas encostas com a ajuda de equipamentos especializados de movimentação de terras de modo a criar uma espécie de terraços separados por taludes altos. Por conseguinte, as uvas são todas vindimadas à mão e ao chegarem à adega são preparados *blends* (lotes) de castas, para que sejam fermentadas juntas de forma a tentar aproveitar ao máximo todas as qualidades de cada casta e para que umas complementem as outras, pois cada casta contribui com as suas características únicas. Já na adega, as uvas são colocadas em lagares, cubas de cimento ou cubas de *inox*, consoante o tipo de vinho que se pretenda e o mosto (sumo da uva) fermenta na presença das massas (partes sólidas do bago), ou seja, a fermentação é feita com maceração pelicular. Assim, é possível extrair grande parte da matéria corante e a componente aromática presentes maioritariamente nas películas (Carvalho, 2005).

A primeira etapa da vinificação tem o nome de “corte” e consiste no esmagamento das uvas por meio de pisa a pé em lagares (método tradicional) ou por meio de sistemas de extracção mecânica com remontadores com bomba ou pisa mecânica robotizada que permitem a libertação e separação do sumo e da polpa das películas conforme mostra a

figura 9, inserida mais adiante. É também nesta fase que são feitas as primeiras correções de acidez e pH do mosto.

Terminado o “corte”, procede-se à movimentação periódica das massas promovendo o arejamento com multiplicação celular das leveduras responsáveis pela transformação do açúcar em álcool, tendo lugar o processo chamado de fermentação alcoólica (figura 9).

Esta etapa é interrompida pela fase de fortificação, a qual corresponde a uma particularidade que faz com que o Vinho do Porto se diferencie de todos os outros vinhos (figura 9). Nesta fase do processo de produção deste tipo de vinho, a fermentação é interrompida pela adição de aguardente vínica com aproximadamente 77% v/v pelo que o açúcar presente depois da fortificação (e também no produto final) é inteiramente natural da uva. O tempo exacto para a adição da aguardente depende do estilo de vinho que se deseja, mas normalmente a maior parte dos mostos é beneficiada quando metade do açúcar do mosto tenha sido metabolizados (Hogg, 2013). Este aumento repentino do grau alcoólico do vinho não permite que as leveduras sobrevivam e assim deixa de ocorrer a degradação dos açúcares em álcool e passa a ocorrer a acumulação de metabolitos secundários da fermentação, tais como o piruvato, que em situações normais são consumidos pelas leveduras no final da fermentação (Carvalho, 2005). Contudo, a aguardente vai representar cerca de 20% do volume final do Vinho do Porto (Mateus & Freitas, 2001) o que, comparado com vinho de mesa, representa uma elevada concentração de etanol que vai influenciar positivamente o equilíbrio dos ésteres e dos acetais e faz com que a extracção de compostos a partir das barricas seja maior (Clarke & Bakker, 2004).

Face ao exposto, verificamos que a maceração das massas é uma etapa fundamental na elaboração do Vinho do Porto, uma vez que a fermentação é interrompida e, por isso, o tempo necessário para a extracção de todos os compostos é muito curto; e é necessária uma maceração intensa de forma a garantir uma boa extracção das antocianinas coradas e dos taninos (matéria corante e aromática) situadas maioritariamente nas películas da uva (Clarke & Bakker, 2004).

O destilado utilizado para este tipo de beneficiação tem que ser o mais neutro possível, sem apresentar características do vinho que lhe deu origem e com ausência de defeitos para que sejam enaltecidas as características das uvas das vinhas do Douro, (Barros & Curvelo-Garcia, 2015; Guimaraens, 2014). Contudo, este tipo de aguardente contém níveis elevados de álcoois superiores, ésteres e aldeídos que têm efeitos directos no sabor e aroma

e efeitos secundários na etapa de maturação do vinho, (Rogerson & Freitas, 2002; Reader & Dominguez, 2003). Mas, segundo a literatura científica e conforme já foi referido é o acetaldeído o principal responsável pelas interações com as antocianinas que vão causar alterações na cor e no sabor do produto final, (Jurd & Somers, 1970;; Somers, 1971; Timberlake & Bridle, 1976; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Pissara *et al.*, 2005). Por conseguinte é fundamental saber a sua composição química e a forma como estes constituintes reagem com os compostos polifenólicos do vinho.

Porque a expressão aromática do Vinho do Porto resulta do efeito combinado de vários compostos, ou seja, estão presentes quatro categorias de aromas: as uvas dão origem ao aroma varietal (primário), as leveduras contribuem com os aromas secundários, a maturação em madeira e o envelhecimento vão desenvolver aromas terciários e a aguardente utilizada para a paragem da fermentação vai dar origem aos aromas quaternários, (Rogerson & Freitas, 2002; Barros & Curvelo-Garcia, 2015).

Tem sido provado, em cenários experimentais, que a componente em aldeídos das aguardentes contribui para o desenvolvimento da cor do Vinho do Porto (Cardoso *et al.*, 1997; Pissarra *et al.*, 2003; Hogg, 2013) durante o processo de armazenamento e envelhecimento. É nesta fase que a cor do vinho passa de um vermelho intenso para um vermelho alaranjado, resultado de várias reacções químicas de oxidação, redução e polimerização que envolvem antocianinas que vão funcionar como precursores de novos pigmentos mais estáveis (Oliveira *et al.*, 2007). A formação destes novos pigmentos pode envolver diferentes mecanismos, dos quais se destacam o fenómeno de copigmentação, o acastanhamento dos flavanóis, a condensação directa entre antocianinas e flavanóis ou as reacções das antocianinas e/ou dos flavanóis com moléculas mais pequenas, como o acetaldeído ou o ácido pirúvico (Pissara *et al.*, 2003). E tem sido provado que a maior parte destas mudanças rápidas de cor, ao nível da diminuição da luminosidade, do aumento da saturação da cor e ao nível do aparecimento de tonalidades amareladas (Pissara *et al.*, 2005), ocorrem durante o primeiro ano de envelhecimento, quando o vinho é armazenado em tonéis, uma vez que a última fase do envelhecimento é feita em garrafa sem qualquer contacto com o ar (Ribereau-Gayon *et al.*, 1983; Mateus & Freitas, 2001), promovendo um envelhecimento mais lento.

A aguardente para beneficiação do mosto tem de ser vínica uma vez que a sua composição reveste especial importância na estabilização da cor do Vinho do Porto tinto (Guimarães, 2014). Os aldeídos (principalmente o acetaldeído), sob condições de aerobiose, são os grandes responsáveis pela estabilização da cor dos vinhos uma vez que

são eles que promovem as ligações entre antocianinas e entre taninos durante a polimerização dos polifenóis (Guimarães, 2014). No Vinho do Porto, o acetaldeído é formado durante a fermentação por leveduras e durante o processo de envelhecimento; e deriva também da aguardente (Hogg, 2013). Porém, este composto pode ligar-se ao SO₂ formando o complexo acetaldeído-bissulfito que vai comprometer a disponibilidade de acetaldeído livre que participa nas reacções de polimerização. Mas à medida que a concentração de SO₂ diminui, através de reacções de oxidação, o acetaldeído combinado começa a libertar-se como acetaldeído livre que tanto contribui para as diferenças no estilo do vinho depois do envelhecimento (Clarke & Bakker, 2004).

Durante os primeiros meses do processo de envelhecimento, a cor aumenta até ao seu máximo – estado designado por *closing up* –, devido à formação de polímeros das antocianinas que se ligam a outros compostos fenólicos através do acetaldeído (Bakker & Timberlake, 1986; Hogg, 2013). Outro aspecto a considerar é o facto de as leveduras libertarem para o meio, durante a fermentação, produtos secundários, tais como o ácido pirúvico (Romero & Bakker, 1999) e o acetaldeído que vão reagir com as antocianinas (malvidina-3-glucosido) dando origem aos seus adutos, vitisinas A e B, (Morata *et al.*, 2003). É esperado que o ácido pirúvico esteja em maiores concentrações no Vinho do Porto do que no vinho de mesa porque é sabido que esta substância é libertada para o meio, pelas leveduras nos estados iniciais da fermentação e é reimportado mais tarde (Morata *et al.*, 2003; Hogg, 2013). Estes novos compostos derivados das antocianinas vão contribuir para a gradual mudança de cor dos vinhos novos porque possuem propriedades específicas de resistência contra descolorações provocadas pelo SO₂ e de estabilização da cor contra alterações bruscas de pH (Marquez *et al.*, 2013).

Quanto às vitisinas do tipo A, estas resultam da reacção entre o ácido pirúvico com as antocianinas aquando da sua formação durante a fermentação alcoólica (Bakker & Timberlake, 1997; Fulcrand *et al.*, 1998). Este composto tem elevada importância no Vinho do Porto porque após um ano de envelhecimento, são o principal derivado de antocianinas detetado por HPLC, devido à sua alta estabilidade e à sua taxa de degradação baixa (Mateus & De Freitas, 2001; Romero & Bakker, 2001), daí a sua elevada importância na cor do vinho. Outros aspectos importantes a considerar são a sua capacidade de reagir contra ataques nucleofílicos e a sua capacidade de regeneração enquanto haja antocianinas e ácido pirúvico disponíveis no meio, (Morata *et al.*, 2007; Marquez *et al.*, 2013).

As vitisinas do tipo B são formadas através de reações de cicloadição de uma molécula de acetaldeído a uma antocianinas (Casassa & Catania, 2006; Marquez *et al.*, 2013), sem elevada importância para o Vinho do Porto.

Recentemente foram detetados novos pigmentos com elevada importância para o perfil cromático dos Vinhos do Porto. Estes compostos, designados de Portisinas foram encontrados após dois anos de envelhecimento do vinho e possuem propriedades corantes invulgares, apresentado a cor azul em condições ácidas (Mateus *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007). Estes novos pigmentos resultam da reação entre o aduto antocianina/ácido pirúvico (vitisina A) com os flavanóis na presença de acetaldeído (Mateus *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004). Isto remete-nos para uma nova panóplia de compostos que em vez de envolverem diretamente as antocianinas como principais percursos, passam a ser os derivados das antocianinas as moléculas agora implicadas.

Tem sido observado por vários enólogos que a contribuição das vitisinas para a cor do vinho é bastante grande, uma vez que ao pH típico do vinho estes compostos apresentam uma cor mais intensa vermelho-alaranjado, que por sua vez é mais intensa que a malvidina-3-glucosido (Clarke & Bakker, 2004). Assim, podemos perceber que a aguardente tem um papel fundamental na produção do Vinho do Porto que assenta no facto de possuir uma elevada concentração de etanol que é um bom solvente para os polifenóis e aumenta a solubilidade dos pigmentos, o que pode estar na origem da formação de novos pigmentos e de possuir um elevado nível de aldeídos, especialmente o acetaldeído, que favorece as reacções entre as antocianinas e os taninos (Mateus & De Freitas, 2001).

VINHO DO PORTO

BREVE CARACTERIZAÇÃO

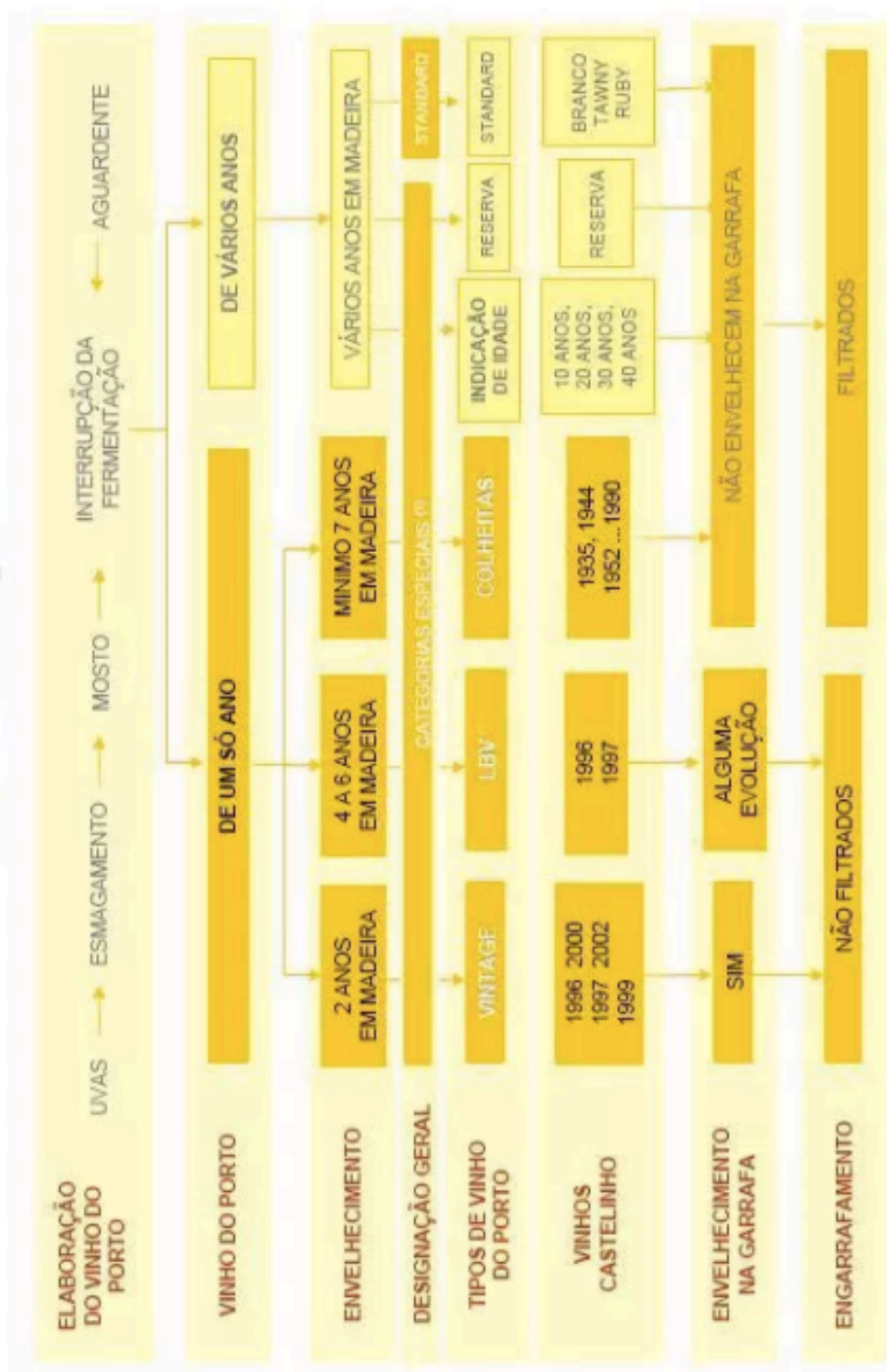


Figura 9: Caracterização do processo de produção do Vinho do Porto

Extraído de: Cipriano, 2015.

3.3. Estilos de Vinho do Porto

Tal como no vinho de mesa, o Vinho do Porto pode ser tinto, branco (seco ou doce) ou rosé. No que diz respeito ao Vinho do Porto tinto os seus diferentes estilos vão depender essencialmente das várias maneiras como pode ser envelhecido. Por conseguinte, estes vinhos podem ser envelhecidos em madeira (barrica ou tonel), sendo que, neste caso, os vinhos evoluem mais rapidamente devido ao contacto com o ar, comparativamente com os vinhos envelhecidos em garrafa na qual passam um longo período, sem contacto com o ar e, por isso, evoluem mais lentamente. Os vinhos obtidos através do primeiro processo de envelhecimento mencionado são do estilo Tawny e os obtidos com o segundo processo de envelhecimento são do estilo Ruby (figura 10). Dentro de cada estilo existe um número variado de diferentes categorias. A maior parte destas categorias de Ruby e Tawny resultam de *blends* (lotes) entre diferentes variedades/cultivares de uvas e entre vinhos produzidos em anos diferentes, o que permite ao produtor criar o seu estilo próprio, apesar da variação sazonal (Clarke & Bakker, 2004).



Figura 10: Diferentes categorias de Vinho do Porto.

Extraído de: Instituto dos Vinhos do Douro e Porto, 2004.

Na figura 10, os dois primeiros vinhos da esquerda representam respectivamente um Vinho do Porto branco novo e um Vinho do Porto branco envelhecido. Os três seguintes correspondem a Vinho do Porto Tawny com diferentes graus de envelhecimento. Por fim, o penúltimo é um Vinho do Porto Ruby e o último corresponde a um Vinho do Porto Vintage.

3.3.1. Estilo Tawny

Os Vinhos do Porto do estilo Tawny são todos envelhecidos em barricas de madeira, em que, devido ao contacto com o ar, os compostos fenólicos tendem a suavizar durante a maturação prolongada, obtendo-se assim vinhos menos encorpados e de uma cor âmbar. Estes vinhos são envelhecidos entre os 10 e os 40 anos, com indicação específica da idade impressa no rótulo; e são vinhos com bastante procura por parte dos consumidores devido ao sabor adocicado a nozes, a especiarias e a madeira de carvalho. Dentro deste estilo temos ainda a categoria de Porto Colheita que resulta de uvas de uma só colheita, envelhecidos num período mínimo de sete anos e obtendo, por isso, uma grande amplitude de cores e de aromas uma vez que depende da variação sazonal de ano para ano.

3.3.2. Estilo Ruby

Os vinhos do Porto do estilo Ruby são envelhecidos de maneira a acentuar as suas características frutadas, a sua estrutura encorpada e a sua cor vermelha intensa. Numa primeira fase, são armazenados em grandes cascos de madeira (balseiros ou tonéis) durante três a cinco anos e só depois é que são feitos *blends* (lotes) para serem posteriormente engarrafados. São vinhos com grande potencial de envelhecimento e dentro deste estilo podemos encontrar quatro categorias: Porto Ruby Reserva, Porto Late Bottled Vintage (LBV), Porto Vintage e Porto (Vintage) Single Quinta Vintage.

Sendo considerado a gama mais alta de Vinho do Porto, o Porto Vintage tem algumas particularidades em relação aos outros vinhos do mesmo estilo. Esta categoria é obtida apenas em anos específicos quando as condições climáticas são favoráveis à produção de vinhos de excelente qualidade a partir de uvas seleccionadas. Após a vinificação, permanece dois a três anos em tonél e depois envelhece em garrafa onde evolui gradualmente durante 10 a 50 anos. Apesar de ser um vinho que se pode consumir enquanto jovem, aperfeiçoa as suas qualidades ao longo dos anos.

III. Descrição e objectivos do trabalho

Em parceria com a empresa The Fladgate Partnership – Vinhos, S.A. (TFP) este trabalho incide sobre o estudo do comportamento dos compostos polifenólicos com repercussões nas características sensoriais (sabor e cor) dos Vinhos do Porto, perante a adição de diferentes aguardentes durante o processo normal de produção.

Tendo como referência os únicos artigos referentes a esta temática, a nosso conhecimento publicados por Cardoso *et al.*, 1997 e Pissarra *et al.*, 2005, este trabalho tem por objectivo avaliar o efeito da composição química das aguardentes nas características sensoriais, cor e sabor dos Vinhos do Porto através de dois tipos de análise, química e sensorial em duas vindimas consecutivas. Ou seja, procura-se tentar perceber de que forma é que os aldeídos presentes na componente aromática das aguardentes, interagem com os polifenóis (antocianinas e taninos) dos mostos formando novos pigmentos mais estáveis e desta forma contribuir para identificar, caracterizar e compreender qual a real contribuição destes aldeídos na estabilização e intensificação da cor do Vinho do Porto.

Foram analisados cinco vinhos em dois anos consecutivos, ou seja numa primeira fase foram estudados dois vinhos da vindima de 2015 obtidos a partir de mosto igual ao qual foi adicionado em separado duas aguardentes diferentes, realizou-se um segundo ano de ensaio com três vinhos da vindima de 2016 também obtidos através do mesmo mosto com adição de três aguardentes distintas.

Assim, o trabalho laboratorial teve início com a determinação do acetaldeído e a determinação do índice de reatividade (I. R.), através de um método desenvolvido por Carvalho, 2005 que permite avaliar o potencial reativo das aguardentes em relação aos compostos polifenólicos dos vinhos. De seguida foram analisados os vinhos generosos, aproximadamente seis meses após a vindima sem contacto com a madeira, utilizando métodos que permitem identificar a componente polifenólica dos mesmos.

Para complementar o estudo analítico dos vinhos generosos, foi feita uma análise sensorial por um painel de provadores experientes e especializados em vinhos generosos. A análise foi feita apenas para os vinhos da colheita de 2016.

IV. Material e métodos

Este capítulo incide sobre o estudo da composição polifenólica e sensorial dos vinhos generosos sob o efeito das diferentes aguardentes, bem como o estudo do índice de reatividade das respectivas aguardentes. Nesta fase o principal objectivo é tentar perceber se de facto a utilização de diferentes aguardentes, no que diz respeito à composição em aldeídos e ao respectivo índice de reactividade, vai conduzir a diferenças significativas, tanto a nível analítico como a nível sensorial, nomeadamente no sabor, aroma e cor.

1. Uvas utilizadas e processo de vinificação dos vinhos generosos

Em 2015 a vinificação foi conduzida em cubas fechadas de aço inox com capacidade aproximada de 25000 L, com remontadores automatizados e temperatura controlada. As uvas utilizadas são provenientes da Sub-região Demarcada Cima Corgo, a mais de 400 m de altitude, das castas tradicionais Touriga Nacional (30%), Touriga Francesa (20%), Vinhaa velhas (mistura de castas – 17%), Tinta Roriz (14%), Tinta Barroca (11%) e Tinto Cão (8%). A vinificação decorreu segundo o processo normal de vinificação, com fermentação aproximada de 4 dias na presença das massas, a prensagem foi feita em prensa horizontal contínua e na fase da fortificação o mosto foi dividido e fortificado com duas aguardentes diferentes . de origem vínica.

Em 2016 a vinificação foi conduzida em cubas de cimento com capacidade aproximada de 15000 L, com sistema de pistões mecânicos cujo ciclo de trabalho é personalizado e controlado pelo enólogo e temperatura controlada. As uvas utilizadas são provenientes da Sub-região Demarcada Cima Corgo, a mais de 400 m de altitude, das castas Tinta Roriz (28%), Touriga Francesa (26%), Vinhas velhas (mistura de castas – 19%), Touriga Nacional (15%), Tinta Barroca (7%) e Tinto Cão (5%). A vinificação decorreu também segundo o processo normal de vinificação, com fermentação aproximada de 4 dias na presença das massas, a prensagem foi feita em prensas hidráulicas verticais do tipo TITAN e na fase de fortificação o mosto foi dividido e fortificado com três aguardentes diferentes de origem vínica.

Tanto em 2015 como em 2016 foram feita correções de pH e SO₂ e em nenhum dos casos foram feitas inoculações.

Seguindo a linha de identificação das aguardentes, os Vinhos do Porto foram também identificados com letras de A até E acompanhadas com o ano de colheita, número 15 para vinhos da vindima de 2015 (A15 e B15) e número 16 para vinhos da vindima de 2016 (C16, D16 e E16).

2. Análises Físico-químicas dos vinhos generosos

No âmbito do trabalho laboratorial foram realizadas análises físico-químicas com o objectivo de caracterizar os vinhos prontos, fortificados com as diferentes aguardentes. Os métodos utilizados são os recomendados pelo OIV e alguns métodos oficiais em Portugal. Todas as análises foram realizadas em triplicado de forma a reduzir eventuais erros e facilitar a análise estatística. De seguida serão descritos todos os métodos.

2.1. Características cromáticas e composição fenólica

2.1.1. Análise da cor: intensidade e tonalidade

O método utilizado para a determinação da intensidade e tonalidade da cor foi o método OIV-MA-AS2-07B: R2009, método prático do tipo IV, também conhecido por método de Sudraud, (Sudraud, 1958). Este método consiste na leituras das absorvências das amostras de vinho centrifugado (7500 rpm) aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm usando células de vidro de 1cm de percurso óptico num espectrofotómetro *Unicam UV/Vis Spectrometer UV4*.

O cálculo da **Intensidade da cor** (IC) é dado pelo somatório das absorvências dos três comprimentos de onda:

$$\text{Equação 1: IC} = (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \times 10^*$$

E o cálculo da **Tonalidade da cor** (TC) é dado pelo quociente entre duas absorvências:

$$\text{Equação 2: TC} = (A_{420} / A_{520})$$

* A multiplicação por 10 é devida à utilização de uma célula de vidro com 1mm de espessura óptica.

2.1.2. Antocianinas Totais, antocianinas coradas e índice de ionização

A quantidade de antocianinas totais livres, de antocianinas coradas e o respectivo índice de ionização foram determinados pelo método de Somers & Evans, que segundo a literatura é um método adaptado do método do metabissulfito, (Somers & Evans, 1977). Este método apenas se aplica em vinhos jovens uma vez que o SO₂ tem uma acção descolorante sobre as antocianinas, tornando-as incolores, o que em vinhos envelhecidos não é possível porque as antocianinas evoluem para formas mais polimerizadas e consequentemente mais estáveis, ficando assim resistentes á descoloração.

Este método analítico consiste na leitura, a 25°C das absorvências das amostras de vinho previamente centrifugado (7500 rpm), ao comprimento de onda de 520 nm após descoloração com metabissulfito de sódio (A₅₂₀^{SO2}), após acidificação com ácido clorídrico (A₅₂₀^{HCL}) e leitura directa.

As **Antocianinas totais**, expressas em mg.L⁻¹ determinam-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 3: Antocianinas totais (mg.L}^{-1}\text{)} = (A_{520}^{\text{HCL}} - (5/3 \times A_{520}^{\text{SO2}})) \times 20$$

As **Antocianinas coradas**, expressas em mg.L⁻¹ determinam-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 4: Antocianinas coradas (mg.L}^{-1}\text{)} = (A_{520} - A_{520}^{\text{SO2}}) \times 20$$

O **Índice de ionização**, expresso em percentagem é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 5: Índice de ionização (\%)} = ((A_{520} - A_{520}^{\text{SO2}}) / (A_{520}^{\text{HCL}} - (5/3 \times A_{520}^{\text{SO2}}))) \times 100$$

2.1.3. Pigmentos totais, pigmentos polimerizados e índice de polimerização

Para a determinação destes parâmetros, o método utilizado foi o método proposto por Somers & Evans, descrito no ponto 2.2.2. sendo que há alteração das fórmulas.

Os **Pigmentos totais**, expressos em u.a. determinam-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 6: Pigmentos totais (u.a.)} = A_{520}^{\text{HCL}}$$

u.a. → unidades de absorvância

Os **Pigmentos polimerizados**, expressos igualmente em u.a. determinam-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 7: Pigmentos polimerizados (u.a.)} = A_{520}^{\text{SO}_2}$$

O **Índice de polimerização**, expresso em percentagem é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 8: Índice de polimerização (\%)} = (A_{520}^{\text{SO}_2} / A_{520}^{\text{HCL}}) \times 100$$

2.1.4. Fenóis totais, fenóis não-flavonóides e fenóis flavonóides

O índice de fenóis totais é um indicador da quantidade total de fenóis que contém a amostra e foi determinado pelo método proposto por Ribéreau-Gayon, (Ribéreau-Gayon, 1970). Este método consiste na leitura das absorvências das amostras de vinho centrifugado (7500 rpm), ao comprimento de onda de 280 nm após previa diluição do vinho com água destilada. As leituras foram feitas em células de 1 cm de percurso óptico num espectrofotómetro *Unicam UV/Vis Spectrometer UV4*.

Os **Fenóis totais**, expressos em mg.L⁻¹ de ácido gálgico determinam-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 9: Fenóis totais (mg.L}^{-1}\text{ ác. gálgico)} = X \times 100 \text{ (factor de diluição)}$$

X é o valor obtido depois de aplicada a curva padrão do ácido gálico (mg.L^{-1}), $Y=0,038X - 0,0344$, onde se substitui o Y pelo valor da absorvência obtido e resolve a equação em ordem ao X.

No caso dos não-flavonóides, estes são determinados pelo método desenvolvido por Kramling & Singleton, (Kramling & Singleton, 1969). Este método consiste na determinação dos fenóis não-flavonóides por leitura das amostras de vinho centrifugado (7500 rpm) ao comprimento de onda de 280 nm após precipitação dos fenóis flavonóides por acção do fomaldeído. As leituras foram feitas em células de 1 cm de percurso óptico num espectrofotómetro *Unicam UV/Vis Spectrometer UV4*.

Os **Fenóis não-flavonóides**, expressos em mg.L^{-1} de ácido gálico determina-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 10: Fenóis não-flavonóides (mg.L}^{-1}\text{ ác. gálico)} = X \times 10 \text{ (factor de diluição)}$$

X é o valor obtido depois de aplicada a curva padrão do ácido gálico (mg.L^{-1}), $Y=0,038X - 0,0344$, onde se substitui o Y pelo valor da absorvência obtido e resolve a equação em ordem ao X.

Os **Fenóis flavonóides** são obtidos pela subtração dos fenóis totais com os fenóis não-flavonóides, expresso em mg.L^{-1} de ácido gálico, que resulta da seguinte fórmula:

$$\text{Equação 11: Flavonóides (mg.L}^{-1}\text{ ác. gálico)} = \text{Fenóis totais} - \text{Nãoflavonóides}$$

2.2. Análise de taninos condensados

2.2.1. Poder tanante

Como foi referido no ponto 1.2.2. do capítulo II, os taninos são substâncias capazes de produzir combinações estáveis com as proteínas ou com outros polímeros como os polissacáridos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), formando agregados insolúveis (Carvalho,

2005). Esta análise química permite verificar qual a capacidade dos taninos do vinho em formas agregados insolúveis com as proteínas, mais especificamente a proteína ASB (Albumina Sérica Bovina), (De Freitas, 1995).

O poder tanante dos vinhos foi determinado de acordo com o procedimento descrito na literatura (De Freitas & Mateus, 2001). A amostra de vinho foi diluída 1/50 com uma solução modelo de vinho (solução hidroalcoólica 12% (v/v), ácido tartárico 5 g.L⁻¹ e pH 3.2) previamente filtrada (0.45 µm). Colocaram-se 4 ml dessa solução diluída de vinho numa célula de turbidímetro e mediu-se a turvação da solução (***d*₀** – ***branco***) por nefelometria (turbidímetro HACH 2100). Em seguida foram adicionados 150 µl de uma solução de ABS (0.8 g.L⁻¹), e a mistura foi agitada num vortex e guardada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante 45 minutos. Ao fim deste tempo mediu-se a turvação da solução (***d***) e determinou-se o poder tanante do vinho pela expressão: **NTU.ml⁻¹ = (*d* – *d*₀) / 0,08** (equação 12).

2.2.2. Análise de catequinas e de proantocianidinas de baixo peso molecular

2.2.2.1. Separação e doseamento de flavanois monoméricos e proantocianidinas de acordo com o seu grau de polimerização

O presente método tem por base os procedimentos descritos na literatura (Sun *et al.*, 1998a; Sun *et al.*, 1998b) e tem por base a separação e doseamento das catequinas e procianidinas do vinhos, dos diferentes constituintes do cacho ou dos extractos, de acordo com o seu grau de polimerização.

O princípio do método assenta na separação das catequinas e procianidinas em três frações (monomérica, oligomérica e polimérica), por eluições sucessivas através de cartuchos C18 Sep-Pak, e respectivo doseamento, utilizando a reação com a vanilina medida colorimetricamente ao comprimento de onda de 500 nm com a ajuda de um espectrofotómetro *Unicam UV/Vis Spectrometer UV4*.

Numa primeira fase foi necessário evaporar 5 ml de amostra através de um evaporador rotativo sob vácuo, Rotavapor R-200, à temperatura de aproximadamente 30 °C a baixa

pressão. De seguida adicionou-se 20 ml de uma solução tampão fosfato a pH 7.0 para dissolver a amostra seca e acertar o pH para 7.0. O cartucho C18 Sep-Pak, constituído por duas partes distintas em série, a superior tC18 Sep-Pak e a inferior C18 Sep-Pak, foi previamente activado, através da passagem de 10 ml de metanol, seguida de 10 ml de H₂O bio destilada (2 vezes) e por último 15 ml de uma solução tampão fosfato a pH 7.0.

A amostra desalcoholizada a pH 7.0 foi então introduzida no cartucho para fixar os polifenóis, sempre com a ajuda de uma rampa de vácuo. De seguida fez-se passar 10 ml de uma solução tampão fosfato diluído em H₂O bio destilada (1/8) para eliminar os ácidos fenólicos e outros compostos indesejáveis e porção de eluente recolhida é rejeitada. Os cartuchos, separadamente, foram colocados a secar em corrente de azoto durante aproximadamente 1 hora.

Após a secagem do cartucho, as eluições foram efectuadas, primeiro com 25 ml de acetato de etilo, onde se elui a fração 1 e 2 ($F_{(1+2)}$) que corresponde às catequinas (F_1) e às procianidinas oligoméricas (F_2), segundo com 15 ml de metanol onde se elui a fração 3 (F_3) que corresponde às procianidinas poliméricas. Estas frações foram então evaporadas no Rotavapor, de forma a eliminar o eluente e de seguida adicionou-se ao resíduo seco 3 ml de uma solução tampão fosfato a pH 7.0.

Para separar as frações F_1 e F_2 , foi necessário activar novamente o cartucho para fazer passar $F_{(1+2)}$ dissolvido e colocou-se a secar em corrente de azoto. Após 1 hora, a separação dos cartuchos foi feita por eluição com 25 ml de éter etílico e com 15 ml de metanol, obtendo-se F_1 e F_2 respectivamente. Estas frações foram evaporadas e o resíduo seco foi dissolvido com 3 ml de uma solução tampão fosfato a pH 7.0.

Todo este método encontra-se resumido no seguinte esquema, (Fig. 11).

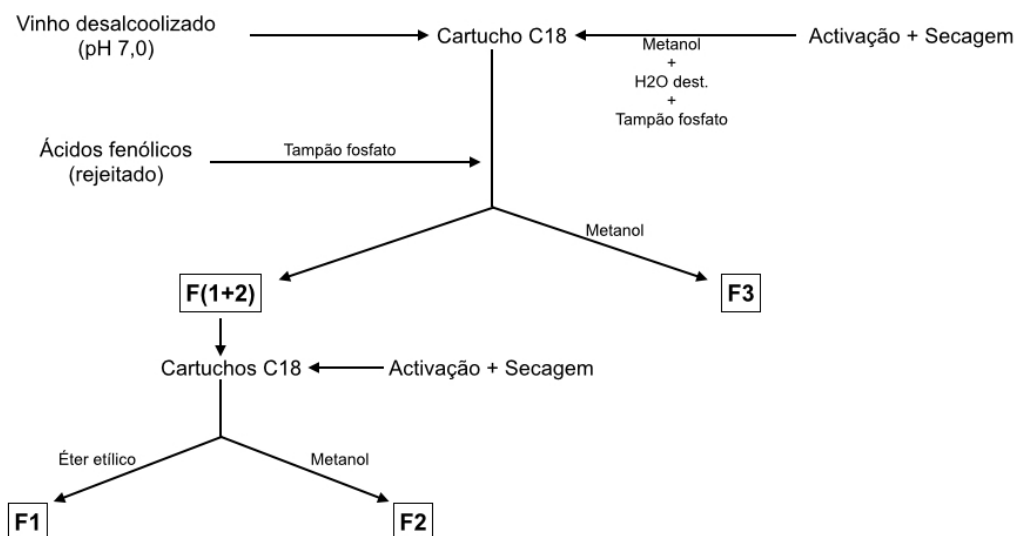


Figura 11 - Resumo esquemático do método descrito por Sun et al., (1998a)

Para quantificar as frações F1, F2 e F3 através da reação com a vanilina, foi necessário preparar dois tubos de ensaio onde se adicionou 1.0 ml da amostra contendo uma das frações F1, F2 ou F3 dissolvida em metanol e 2.5 ml de uma solução de ácido sulfúrico/metanol (25:75 v/v). No tubo que serviu de referência adicionou-se mais 2.5 ml de metanol e no outro adicionou-se 2.5 ml de uma solução de vanilina a 1% (p/v) em metanol.

Na quantificação da fração F1, o registo da absorvância a 500nm no espectrofotómetro *Unicam UV/Vis Spectrometer UV4* foi realizada após um tempo de reação de 15 minutos em banho-maria com temperatura aproximada de 30°C. Para a quantificação das frações F2 e F3 a leitura da absorvância foi efectuada diretamente a 500 nm à temperatura ambiente mas foi registada a absorvância máxima após estabilização.

Os resultados são expressos em mg.L^{-1} e calculados a partir de uma fórmula específica para vinhos que tem por base a curva de calibração desenvolvida para cada fração, (Sun *et al.*, 1998b). Cada amostra foi replicada três vezes.

2.2.2.2. Fracionamento de 3-flavanois monoméricas e proantocianidinas de baixo peso molecular por cromatografia líquida em coluna de poliamida

Para o fracionamento dos 3-flavanois de baixo peso molecular, utilizou-se o método descrito na literatura (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1990). A coluna de poliamida (Macherey-Nagel, Alemanha) foi preparada com pó de vidro e poliamida TLC 6 de forma a criar cromatografia em camada fina. De seguida eluiu-se 5 ml de vinho com 5 g de poliamida TLC 6 e com 80 ml de uma solução tampão fosfato a pH 7.0 para eliminar ácidos fenólicos e outros compostos que possam interferir no método. Os 3-flavonois monoméricos foram eluídos com 50 ml de acetato de etilo/H₂O destilada (30:70 v/v) e as procianidinas oligoméricas de baixo peso molecular foram eluídas com 50 ml de acetona/H₂O destilada (75:25 v/v). Ambas as frações foram evaporadas até á secura num Rotavapor R-200 sob vácuo a 30°C aproximadamente, posteriormente dissolvidas com 1.2 ml de metanol/H₂O destilada (50:50 v/v), filtradas (0.45 µm) e injetadas numa coluna de HPLC. Cada amostra foi analisada em triplicado.

2.2.2.3. Quantificação de 3-flavanois monoméricos e de procianidinas oligoméricas de baixo peso molecular por HPLC.

As frações obtidas anteriormente foram analisadas por injeção direta usando um equipamento HPLC constituído por um detector UV-Vis (Waters 2487) e uma bomba Merck L-7100. A separação é feita à temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) através de uma coluna C18 de fase reversa (LichroCart, Merck, Alemanha) com as dimensões de 250 mm \times 4.6 mm \times 5 µm. A detecção foi feita ao comprimento de onda de 280 nm, cada amostra foi analisada em triplicado e os resultados foram expressos em mg.L⁻¹.

Para a quantificação dos 3-flavanóis monoméricos os solventes utilizados foram: solvente A, H₂O bio destilada/ácido acético (97.5:2.5 v/v) e solvente B, acetonitrilo/solvente A (80:20 v/v). A eluição foi criada pela bomba com um gradiente sempre linear de 7-25% de solvente B dos 0 aos 31 minutos, seguido de um gradiente de lavagem (metanol/H₂O bio destilada, 50:50 v/v) dos 32 aos 50 minutos a um fluxo de 0.9 ml.min⁻¹. A coluna estabilizou dos 51 aos 65 minutos sobre as condições de gradiente inicial.

Para a quantificação das procianidinas oligoméricas de baixo peso molecular os solventes utilizados foram: solvente A, H₂O bio destilada e solvente B, H₂O bio destilada/ácido acético (90:10 v/v) aplicados a um fluxo de 1.0 ml.min⁻¹. Mais uma vez a eluição foi criada pela bomba a um gradiente linear de 10-70% de solvente B dos 0 aos 45 minutos, linear de 70-90% de solvente B dos 45 aos 70 minutos, isocrático de 90% de solvente B dos 70 aos 82 minutos, linear de 90-100% de solvente B dos 82 aos 85 minutos e isocrático de 100% de solvente B dos 85 aos 90 minutos, seguido do gradiente de lavagem (metanol/H₂O bio destilada, 50:50 v/v) dos 91 aos 100 minutos. A coluna estabilizou dos 101 aos 120 minutos sobre as condições de gradiente iniciais.

A quantificação e caracterização dos 3-flavanóis monoméricos e das procianidinas oligoméricas tem por base os trabalhos desenvolvidos por Ricardo-da-Silva *et al.*, 1990, Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991b e Rigaud *et al.*, 1991.

No presente trabalho foi possível identificar os seguintes compostos: (+)-catequina; (-)-epicatequina; (-)-epigallocatequina; (+)-gallocatequina; procianidina dimérica B1 [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(+)-catequina]; procianidina dimérica B2 [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina]; procianidina dimérica B3 [(+)-catequina-(4 α →8)-(+)-catequina]; procianidina dimérica B4 [(+)-catequina-(4 α →8)-(-)-epicatequina]; procianidina dimérica B1 3-O-galato [(-)-epicatequina-3-O-galato-(4 β →8)-(+)-catequina]; procianidina dimérica B2 3-O-galato [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina]; procianidina dimérica B2 3'-O-galato [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina-3-O-galato] e procianidina trimérica C1 [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina], (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991b).

2.2.3. Análise de antocianinas monoglucósidas por HPLC

As antocianinas monoglucósidas e os seus respectivos derivados acilados, resultantes da esterificação com os ácidos cafeico, acético e p-cumárico, foram analisados por HPLC segundo o método descrito na literatura, (Dallas & Laureano, 1994).

Os vinhos foram injetados diretamente no sistema de HPLC, constituído por um detector UV-Vis (LC95) e uma bomba Series 200. A separação e quantificação é feita à temperatura ambiente (\approx 25°C) através de uma coluna C18 de fase reversa (LichroCart, Merck, Alemanha) com as dimensões de 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m. A detecção foi feita ao

comprimento de onda de 520 nm, cada amostra foi analisada em triplicado e os resultados foram expressos em mg.L^{-1} .

Os solventes utilizados foram: solvente A, H_2O bio destilada/ácido fórmico (90:10 v/v) e solvente B, H_2O bio destilada/ácido fórmico/acetonitrilo (60:10:30 v/v). A eluição foi criada pela bomba a um gradiente de 80% de A e 20% de B nos primeiros 70 minutos, seguidos de 100% de B durante 10 minutos e 80% de A e 20% de B nos últimos 10 minutos, a um fluxo de 0.7 mL.min^{-1} . A lavagem do sistema foi feita com metanol/ H_2O bio destilada (50:50 v/v).

As antocianinas monoglucósidas e os seus derivados acilados foram identificados com base nos espectros e nos tempos de retenção por comparação com cromatogramas padrão. As concentrações destes compostos foram obtidas a partir das curvas de calibração da malvidina 3-glucósida.

3. Determinação do potencial reativo das aguardentes (I. R. – índice de reatividade)

Com o objectivo de avaliar a capacidade de interação dos aldeídos das aguardentes com os 3-flavanóis (taninos condensados) e antocianinas dos vinhos, João M. Pissarra Soeiro de Carvalho (2005) desenvolveu um método ao qual deu o nome de Índice de Reatividade. Este método tem por base a propriedade do anel floroglucinol (anel A da unidade de 3-flavanol), de atuar como um centro nucleófilo para reagir com a função aldeído quando ambos se encontram sob a forma de carbocatião em meio ácido, (Carvalho, 2005). Destas reações resultam os aductos tanino-aldeído que ocorrem de forma natural no vinho, são a primeira etapa da evolução das catequinas pela reação com o acetaldeído que conduz ao aparecimento de estruturas mais polimerizadas, (Somers, 1971; Carvalho, 2005). Por conseguinte, esta propriedade tem sido utilizada por vários autores para determinar o grau de polimerização dos 3-flavanóis (taninos condensados), uma vez que quanto maior for o grau de polimerização dos mesmos, menor será a quantidade de sítios nucleófilos (carbonos C6 e C8 do anel A) disponíveis para reagir com os aldeídos, (Carvalho, 2005).

Para a elaboração deste método foram utilizadas cinco aguardentes, duas delas referentes aos vinhos da vindima de 2015 e as outras três referentes aos vinhos da vindima de 2016.

3.1. Princípio do método

O método ocorre essencialmente em duas etapas (Fig. 12), sendo que a primeira (I) diz respeito à reação dos aldeídos presentes nas aguardentes com as (+)-catequinas nos sítios nucleófilos do anel A (carbono C6 ou C8), enquanto que na segunda etapa (II) dá-se a reação de um aldeído com a catequina que apresenta os sítios nucleófilos ainda disponíveis para formar um aducto azul, (Carvalho, 2005). Quanto mais extensa for a segunda etapa, maior será a coloração azul, menor terá sido a reação com as catequinas o que vai resultar numa menor reatividade da aguardente.

Segundo a literatura o aldeído utilizado neste método deve ser o *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACH), uma vez que apresenta alguma especificidade no que diz respeito à reação com estruturas que apresentam um anel floroglucinol semelhante ao anel A da estrutura base das catequinas e é uma reação que apresenta melhores resultados em meio ácido e com o metanol como solvente, (Vivas *et al.*, 1994; Carvalho, 2005).

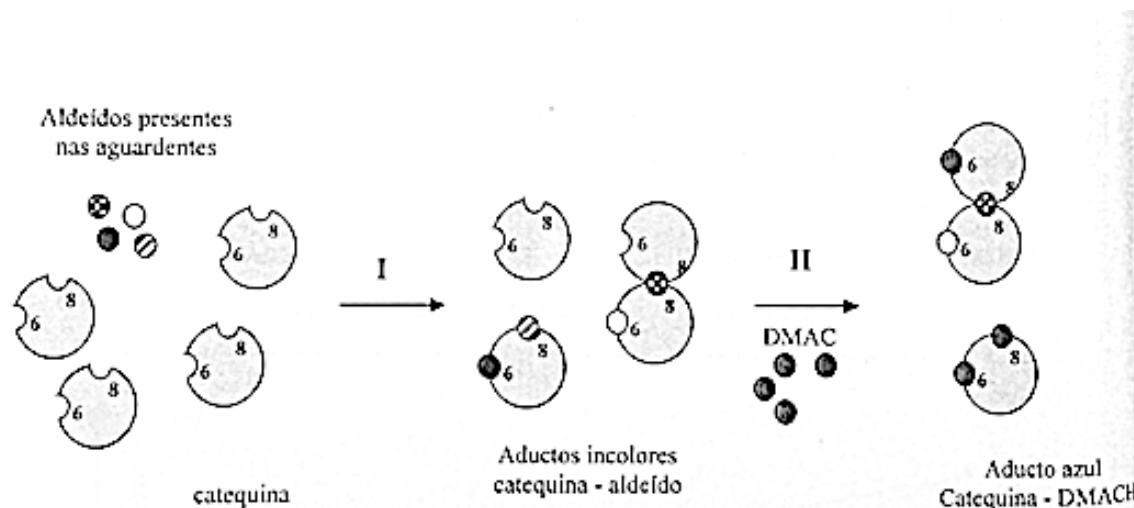


Figura 12 – Esquema das duas etapas que envolvem o método I. R.

Extraído de: Carvalho, 2005, p. 50

3.2. Procedimento experimental

Tendo sido um método desenvolvido por João Manuel Pissarra Soeiro de Carvalho (2005), na sua tese de doutoramento, o procedimento experimental assenta essencialmente na preparação de quatro soluções.

Numa primeira fase colocou-se num tudo de ensaio de hidrólise com tampa de rosca 5 ml de uma solução metanol:ácido sulfúrico (1:1, v/v) e adicionaram-se 5 ml de solução de (+)-catequina (100 mg.L⁻¹ em metanol) e ainda 5 ml da amostra de aguardente diluída em metanol (1:1, v/v). Os tubos foram fechados e a mistura foi deixada a reagir durante 2 horas em banho-maria a 35°C. Passadas as 2 horas, retirou-se 500 µl da mistura anterior, à qual se adicionou 5 ml de uma solução de DMACH (100 mg/100 ml em metanol). A nova mistura foi deixada a reagir durante 10 minutos em banho-maria a 35°C.

Simultaneamente, preparou-se um ensaio em branco (**Br**) no qual a amostra de aguardente foi substituída por uma solução hidroalcoólica de 77% (v/v), de modo a simular uma aguardente isenta de aldeídos.

Decorridos os 10 minutos, procedeu-se à leitura das absorvências do ensaio em branco (**Br**) e da amostra (**A**) no espectrofotómetro a λ 640 nm, em células de vidro de 10 mm de percurso óptico.

O índice de reatividade é dado pela seguinte expressão: **IR = (Br-A)/Br×100** (equação 13)

O resultado é expresso em percentagem.

4. Análise sensorial

4.1. Vinhos generosos

A análise sensorial apenas foi realizada para os vinhos generosos da colheita de 2016. A prova foi realizada em Julho de 2017 pela TFP. O painel foi constituído por 6 provadores especializados em análises sensoriais de vinhos fortificados. A prova foi dividida em duas partes. A primeira parte consiste em três sequências em que em cada uma delas é apresentado ao provador um conjunto de três copos com a mesma quantidade de vinho, um dos vinhos é utilizado em dois dos três copos e o outro vinho no terceiro copo e de seguida foi pedido ao provador que identifique o vinho que é diferente. A identificação pode ser feita com o símbolo (+) caso seja de melhor qualidade que as restantes, ou com o símbolo (-) caso a amostra seja de pior qualidade que as restantes. O provador teve ainda de identificar os parâmetros que influenciaram a sua decisão, visual, olfativo ou gustativo.

A segunda parte é constituída pela quarta sequência em que são novamente apresentados três copos ao provador mas desta vez com os três vinhos diferentes, e este teve de colocar por ordem de preferência de 1 a 3, onde 3 é o de melhor qualidade e 1 o de pior qualidade e mais uma vez identificar os parâmetros que influenciaram a sua escolha.

A ficha de prova utilizada encontra-se na figura 1 dos anexos.

4.2. Análise sensorial das Aguardentes

A análise sensorial das Aguardentes foi desenvolvida pela Câmara de Provadores (L0235) do IVDP acreditada pelo IPAC. No Quadro 1 estão presentes os ensaios realizados e o respectivo método utilizado. No Anexo I estão todos os certificados de controlo de qualidade das aguardentes, onde esta presente esta informação.

Quadro 1 - Parâmetros analisados na análise sensorial das aguardentes

Ensaio	Método de ensaio
Limpidez	MIVDP101-1-10
Cor	MIVDP101-2-10
Aroma	MIVDP101-3-10
Sabor	MIVDP101-4-10
Defeito	MIVDP101-5-10
Designação	MIVDP101-10-3

5. Tratamento estatístico

Relativamente ao tratamento estatístico, foram analisadas as médias e desvios padrão das colheitas de 2015 e 2016, tendo sido igualmente verificada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes vinhos e pelos fatores das colheitas. Para tal foram aplicados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis dada a reduzida dimensão amostral. Os resultados foram introduzidos e analisados no programa SPSS.

As diferenças foram consideradas significativas considerando um intervalo de confiança superior a 95%, ($p < 0.05$).

V. Resultados e discussão

Conforme já foi indicado anteriormente, este trabalho procura estudar o efeito dos aldeídos presentes nas aguardentes no comportamento dos compostos polifenólicos dos vinhos generosos, após a sua adição ao mosto como parte integrante do processo normal de produção de Vinho do Porto. Os resultados e discussão serão abordados em duas perspectivas: primeiro a comparação, dentro do mesmo ano dos vinhos fortificados com aguardentes distintas e segundo, comparação dos dois anos de colheita. Por outro lado será discutido os resultados obtidos quanto ao IR das aguardentes.

De modo a facilitar a análise dos dados obtidos para os vinhos generosos, estes foram condensados numa só tabela para cada ano de colheita com todos os parâmetros analisados, com o objectivo de tentar perceber se de facto a composição da aguardente influencia as características analíticas e sensoriais do produto final.

1. Identificação das aguardentes, composição em aldeídos e IR

1.1. Identificação das aguardentes em estudo e respectiva composição em aldeídos

O estudo da composição das aguardentes em aldeídos foi disponibilizado pela TFP em conformidade com o Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP), desenvolvido pelo Laboratório do IVDP (L0115) acreditado pelo IPAC. Apenas me foi disponibilizada a concentração do acetaldeído. A concentração deste aldeído identificado nas aguardentes comerciais de 2015 e 2016 está presente no Quadro 2.

O vinho generoso da colheita de 2015 foi fortificado com as aguardentes vinícolas A15 e B15 separadamente e o vinho generoso da colheita de 2016 foi fortificado com três aguardentes originalmente diferentes, C16 origem vinícola, D16 lote especial e E16 origem vitícola.

Quadro 2 – Concentração do acetaldeído das aguardentes comerciais utilizadas em 2015 e 2016.

	Aguardentes	AC
Vindima	AD GED VIN 15 (A15)	8
	2015 AD GED VIN 15 (B15)	8
Vindima	AD GED VIN 16 (C16)	9
	2016 AD LB ESP 15 (D16)	8
	AD SLD VIT 16 (E16)	9

Nota: os resultados estão expressos em mg/100 cm³ de álcool puro.

As aguardentes foram identificadas consoante o ano de colheita e o tipo de aguardente, ou seja aguardentes com o número 15 correspondem à colheita de 2015 e consequentemente aguardentes com o número 16 correspondem à colheita de 2016, sendo que a aguardente D16 é do ano de 2015 mas foi utilizada na vindima de 2016. Por outro lado, as siglas VIN, VIT e ESP dão a indicação respectivamente de aguardente de origem viníca, aguardente de origem vitícola e aguardente especial. As restantes siglas (GED, LB e SLD) dizem apenas respeito à empresa de destilação que lhes deu origem.

Os resultados obtidos através do método MIVDP 55-09 são da mesma ordem de grandeza e os certificados de controlo de qualidade das aguardentes estão disponíveis nos anexos 2, 3, 4, 5 e 6.

Contudo, podem estar presentes outros aldeídos, como o formaldeído, o propanal, o 2-metilbutanal, o 3-metilbutanal, o 2-metilpropanal, o benzaldeído e o metilglioxal, anteriormente identificados em Cognac, Armagnac e brandies, (Cabezudo & Almy, 1988; Vanderlinder, 1995; Carvalho, 2005), o que poderá explicar a obtenção de valores de índice de reactividade consideravelmente diferentes para teores de acetaldeídos muito idênticos nas cinco aguardentes vínicas usadas neste estudo de dois anos.

1.2. Determinação do potencial reativo das aguardentes (IR – Índice de Reatividade)

A partir de 1991 foi autorizado a compra e venda de aguardente para beneficiação, sendo desta forma possível obter aguardente de alta qualidade que consequentemente veio aumentar e muito a qualidade do Vinho do Porto, (Guimarães, 2014). Assim é importante conhecer bem os constituintes da aguardente e a forma como eles interagem com os compostos fenólicos do mosto. Uma vez que já foi provado por vários autores que o acetaldeído, um dos aldeídos mais importantes presentes nas aguardentes, induz a polimerização dos taninos e a copolimerização entre os 3-flavanóis e as antocianinas, (Jurd & Somers, 1970; Somers, 1971; Timberlake & Bridle, 1976; Rivas-Gonzalo et al., 1995; Pissarra et al., 2003).

Desta forma o IR, expresso em percentagem, permite-nos perceber a capacidade dos aldeídos das aguardentes em interagir com os compostos fenólicos dos mostos, modificando as suas características sensoriais, cor e sabor.

As aguardentes foram previamente caracterizadas no que diz respeito à sua composição em acetaldeído e com o estudo desenvolvido por Carvalho, 2005 é possível perceber que os aldeídos apresentam reatividades significativamente diferentes, sendo o acetaldeído, o propanal e o 3-metilbutanal os mais reativos. Por isso é importante perceber que a concentração e o tipo de aldeído interferem diretamente no IR da aguardente.

Como se pode verificar no quadro 3, para cada ano de colheita, as aguardentes apresentam IR significativamente distintos entre si ($p < 0.05$), com exceção do ano de 2016 entre as aguardentes C16 e E16 uma vez que não diferem entre si, que por sua vez são as aguardentes com valores de IR mais baixos. As aguardentes utilizadas na colheita de 2015 apresentam os valores de IR mais elevados. Tendo em conta que só foi possível ter acesso ao valor da concentração do acetaldeído (quadro 2), e os resultados são da mesma ordem de grandeza para todas as aguardentes, não é possível correlacionar com os IR obtidos. Era necessário ter acesso ao valor total de aldeídos de cada aguardente e quais os aldeídos presentes e em que percentagem para correlacionar com os valores de IR obtidos. É de facto importante saber que o IR de uma aguardente é determinante para perceber a capacidade de reação dos aldeídos com os compostos fenólicos do mosto mas a sua determinação não depende só da quantidade total do aldeídos e da concentração individual de cada um, uma vez que há aldeídos mais reativos que outros.

Quadro 3 – Índice de Reatividade das aguardentes utilizadas na colheita de 2015 e na colheita de 2016

Aguardentes	IR (%)
Colheita 2015	
A15	16,65±11,06 ^a
B15	29,67±11,64 ^b
Colheita 2016	
C16	1,46±8,70 ^a
D16	7,22±10,54 ^b
E16	-3,05±3,21 ^a

Dentro de cada ano, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p<0.05$).

Esta análise foi repetida 10 vezes de forma a tentar reduzir ao máximo o erro humano.

2. Caracterização analítica dos vinhos da colheita de 2016

Foi realizada e disponibilizada pela empresa uma análise analítica dos vinhos referentes á colheita de 2016 após a passagem para barrica, considerando o lote pronto. O quadro 4 mostra o parâmetro analítico analisado e o respectivo resultado.

Quadro 4 – Caracterização analítica dos vinhos generosos da colheita de 2016

Amostra	C16	D16	E16
Volume (L)	625	620	645
Teor alcoólico (% v/v)	19,10	20,35	19,95
Baumé (°Bé)	3,60	3,20	3,40
Acidez Volátil (g/L ac. acético)	0,15	0,24	0,18
Acidez Total (g/L ac. tartárico)	3,84	3,91	3,87
Sulfuroso Total (mg/L)	36	36	37
pH	3,83	3,85	3,81

Uma vez que se trata do mesmo mosto estes parâmetros sofrem pequenas alterações. Quanto ao teor alcoólico, para todos os vinhos o valor obtido encontra-se dentro do limite legal (de 15% a 22%). A acidez total e a acidez volátil não excedem os limites legais estabelecidos pelo Instituto da Vinha e do Vinho segundo as bases jurídicas Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo III- 1 d) e Reg. (CE) nº 491/2009, Anexo I- 11 c) respectivamente.

3. Análise individualizada dos 3-flavanóis

Os flavanóis foram analisados por HPLC, após separação prévia por cromatografia líquida em coluna de poliamida e na figura 13 e na figura 14 estão representados um dos cromatogramas obtidos a título de exemplo. A figura 13 diz respeito ao perfil cromatográfico da fracção das catequinas (3-flavanóis monoméricos) e a figura 14 corresponde ao perfil cromatográfico da fracção das procianidinas oligoméricas de baixo peso molecular (3-flavanóis oligoméricos). Nestes cromatogramas o eixo do x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo do y à leitura da absorvência a 280 nm, no detector UV-Vis do HPLC.

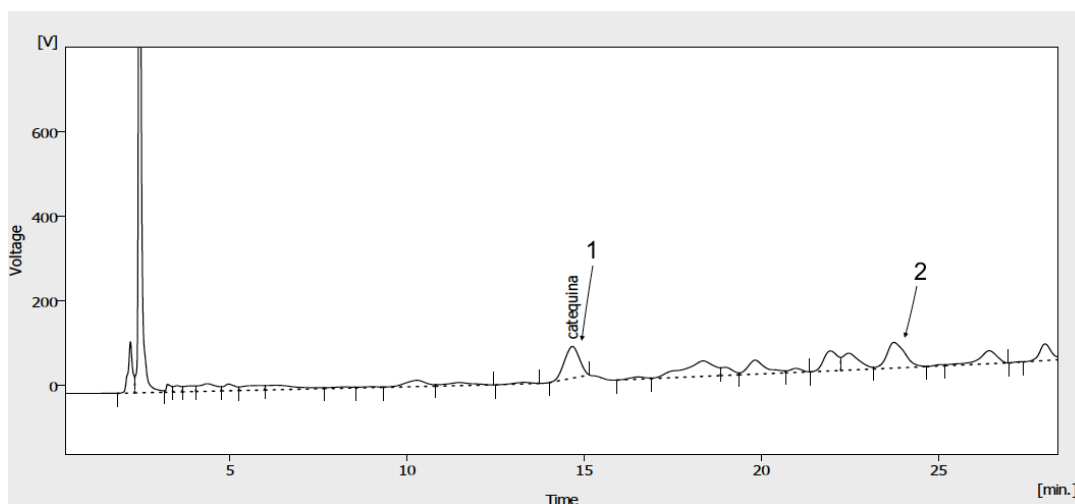


Figura 13 – Cromatograma de HPLC registado a 280 nm da fracção de 3-flavanóis monoméricos de uma das amostras

Legenda da figura 13:

1 – (+)-catequina; 2 – (-)-epicatequina.

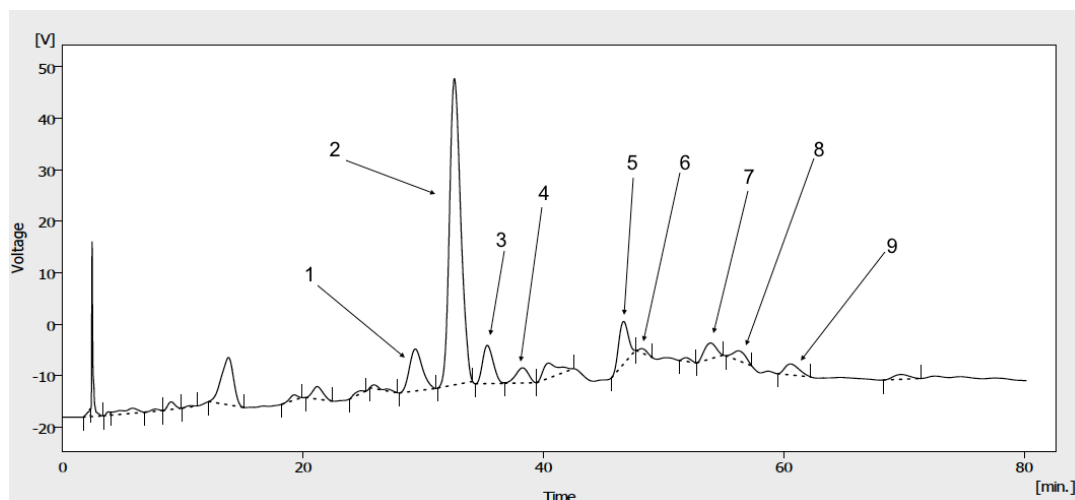


Figura 14 – Cromatograma de HPLC registado a 280 nm da fracção de 3-flavanóis oligoméricos de uma das amostras (procianidinas)

Legenda da figura 14:

1 – procianidina dimérica B3; 2 – procianidina dimérica B1; 3 – procianidina trimérica T2; 4 – procianidina dimérica B4; 5 – procianidina dimérica B2; 6 – procianidina dimérica B2 3-O-galhato; 7 – procianidina dimérica B2 3'-O-galhato; 8 – procianidina dimérica B1 3-O-galhato; 9 – procianidina trimérica C1

Os resultados obtidos estão presentes no quadro 5 para o vinho fortificado com A15 e B15 e para o vinho fortificado com C16, D16 e E16. Para cada aguardente o valor representado resulta da média de três repetições e o respectivo desvio-padrão. De forma a facilitar a compreensão dos resultados a análise estatística deste parâmetro foi aplicada ao somatório de todos os compostos deste grupo e será analisada para cada ano de colheita comparando o efeito das diferentes aguardentes.

Quadro 5 – Resultados da quantificação dos 3-flavanóis monoméricos e oligoméricos por HPLC e quantificação total dos mesmos

Composto	3-flavanóis				
	Colheita 2015		Colheita 2016		
	A15	B15	C16	D16	E16
(+)-catequina	5,56 ± 1,07	6,61 ± 0,29	8,45 ± 0,62	9,01 ± 1,21	9,69 ± 1,08
(-)-epicatequina	3,80 ± 1,90	3,24 ± 1,79	3,94 ± 0,39	4,49 ± 0,14	5,52 ± 0,36
Procianidina B3	0,53 ± 0,07	0,23 ± 0,22	3,06 ± 0,67	2,24 ± 0,79	2,77 ± 0,53
Procianidina B1	7,11 ± 1,81	8,03 ± 0,99	24,74 ± 5,02	25,40 ± 4,61	23,08 ± 5,1
Procianidina T2	12,12 ± 2,67	14,37 ± 3,59	4,45 ± 1,84	4,79 ± 1,78	2,59 ± 0,64
Procianidina B4	ND	ND	0,47 ± 0,39	0,97 ± 0,11	0,69 ± 0,57
Procianidina B2	4,82 ± 0,94	6,70 ± 0,71	2,19 ± 0,60	2,46 ± 0,26	2,89 ± 0,93
Procianidina B2 3-O-galhato	0,59 ± 0,20	0,67 ± 0,17	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,27 ± 0,13
Procianidina B2 3'-O-galhato	0,98 ± 0,26	1,05 ± 0,27	0,50 ± 0,12	0,28 ± 0,15	0,24 ± 0,14
Procianidina B1 3-O-galhato	4,12 ± 0,84	5,57 ± 0,83	0,10 ± 0,12	0,28 ± 0,39	0,13 ± 0,06
Procianidina C1	2,02 ± 0,49	1,95 ± 0,48	0,76 ± 0,41	0,84 ± 0,40	0,84 ± 0,19
Total de flavanóis de baixo peso molecular (mg.L⁻¹)	41,7 ± 8,6 ^a	48,4 ± 6,8 ^a	48,8 ± 8,6 ^a	50,9 ± 6,4 ^a	48,7 ± 7,9 ^a

Legenda: ND – não detetado.

Na mesma linha, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p < ,05$)

Para os dois anos não existem amostras significativamente diferentes.

4. Análise individualizada das antocianinas monoglucósidas

As antocianinas monoglucósidas foram obtidos por injeção direta do vinho no HPLC e a figura 15 representa um dos cromatogramas representativo de todas as amostras. Igualmente aos cromatogramas anteriores, o eixo do x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo do y à leitura a absorvência a 520 nm, no detector UV-Vis do HPLC.

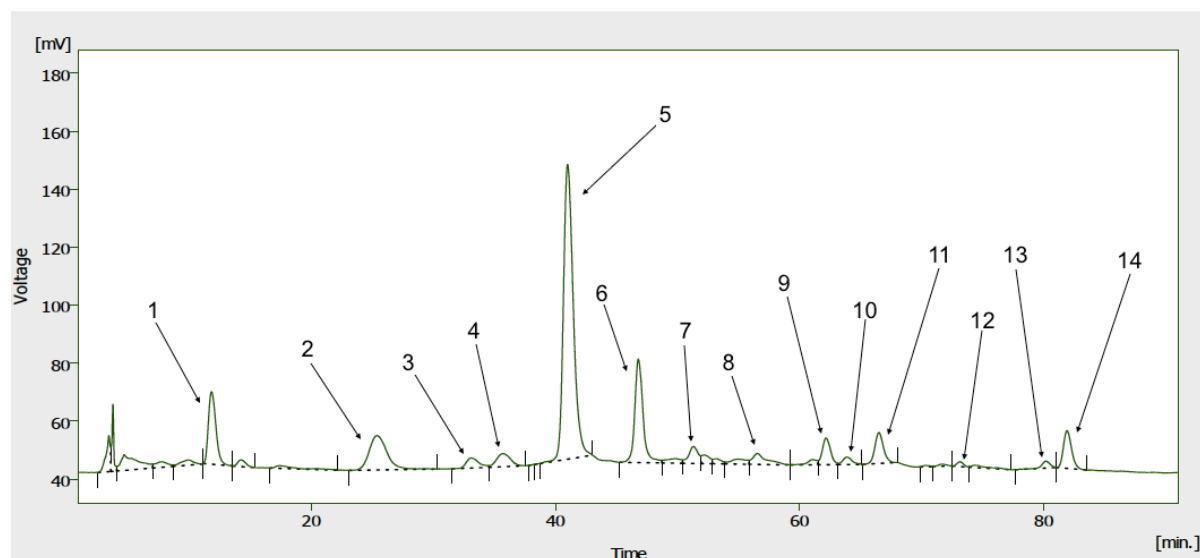


Figura 15 - Cromatograma de HPLC registado a 520 nm da fracção de antocianinas monoglucósidas de uma das amostras

Legenda:

1 – 3-glucósido de delphinidina; 2 – 3-glucósido de cianidina; 3 – 3-glucósido de petunidina; 4 – 3-glucósido de peonidina; 5 – 3-glucósido de malvidina; 6 – 3-acetilglucósido de delphinidina; 7 – 3-acetilglucósido de cianidina; 8 – 3-acetilglucósido de petunidina; 9 – 3-acetilglucósido de peonidina; 10 – 3-cumaroilglucósido de delphinidina; 11 – 3-acetilglucósido de malvidina; 12 – 3-cumaroilglucósido de petunidina; 13 – 3-cumaroilglucósido de peonidina; 14 – 3-cumaroilglucósido de malvidina

Não foram detetados em nenhuma das amostra as antocianinas, cujos monossacáridos estivessem esterificados pelo ácido cafeico nem o 3-cumaroilglucósido de cianidina. Os resultados obtidos para cada composto estão representados no quadro 6 para o vinho fortificado com A15 e B15 e para o vinho fortificado com C16, D16 e E16. Para cada aguardente o valor representado resulta da média de três repetições e o respectivo desvio-padrão. De forma a facilitar a compreensão dos resultados a análise estatística deste parâmetro foi aplicada ao somatório de todos os compostos e foi analisada para cada ano de colheita comparando o efeito das diferentes aguardentes, (quadro 6).

Quadro 6 - Resultados da quantificação das antocianinas monoglucósidas por HPLC

Composto	Antocianinas monoglucósidas				
	Colheita 2015		Colheita 2016		
	A15	B15	C16	D16	E16
3-glucósido de delphinidina	12,28 ± 0,02	15,08 ± 0,18	6,40 ± 0,13	6,94 ± 0,39	6,11 ± 0,00
3-glucósido de cianidina	6,15 ± 0,31	6,83 ± 0,07	ND	ND	ND
3-glucósido de petunidina	3,08 ± 1,60	1,35 ± 0,08	3,88 ± 0,28	3,84 ± 0,21	3,59 ± 1,09
3-glucósido de peonidina	1,08 ± 0,32	2,78 ± 0,00	2,44 ± 0,19	2,32 ± 0,32	2,17 ± 0,45
3-glucósido de malvidina	31,48 ± 2,24	35,49 ± 2,05	42,36 ± 0,78	43,37 ± 3,15	41,42 ± 2,7
3-acetilglucósido de delphinidina	17,41 ± 2,77	18,45 ± 1,50	4,55 ± 0,29	5,13 ± 0,04	4,38 ± 0,49
3-acetilglucósido de cianidina	1,51 ± 0,28	2,18 ± 0,20	0,76 ± 0,16	0,70 ± 0,10	0,49 ± 0,20
3-acetilglucósido de petunidina	1,96 ± 0,16	1,35 ± 0,13	0,70 ± 0,14	0,59 ± 0,18	0,39 ± 0,09
3-acetilglucósido de peonidina	2,56 ± 0,01	1,51 ± 0,96	0,84 ± 0,11	0,84 ± 0,18	0,60 ± 0,07
3-cumaroilglucósido de delphinidina	2,23 ± 0,04	2,44 ± 0,02	0,88 ± 0,57	0,62 ± 0,04	0,44 ± 0,04
3-acetilglucósido de malvidina	2,00 ± 1,01	3,22 ± 0,01	8,46 ± 0,59	8,11 ± 0,34	7,59 ± 0,99
3-cumaroilglucósido de petunidina	0,92 ± 0,50	0,61 ± 0,18	0,56 ± 0,06	0,79 ± 0,18	0,52 ± 0,02
3-cumaroilglucósido de peonidina	0,73 ± 0,20	0,65 ± 0,07	1,07 ± 0,09	1,14 ± 0,17	0,78 ± 0,03
3-cumaroilglucósido de malvidina	4,84 ± 2,37	4,83 ± 0,06	9,73 ± 0,36	10,03 ± 0,90	8,55 ± 0,49
Total antocianinas monoglucósidas (mg.L⁻¹)	88,3 ± 2,3 ^a	96,8 ± 1,0 ^a	82,6 ± 0,7 ^a	84,4 ± 4,8 ^a	77,1 ± 6,0 ^a

Legenda: ND – não detetado

Na mesma linha, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p < ,05$)

Para os dois anos não existem amostras significativamente diferentes

5. Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015 e 2016

5.1. Vinhos generosos da colheita de 2015

As análises dos parâmetros em questão foram efectuadas aproximadamente 6 meses após a vindima. Os parâmetros analisados já foram descritos anteriormente e o quadro 7 apresenta os resultados obtidos em cada parâmetro depois de ter sido aplicado um teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes (18 dimensões), com o objectivo de verificar a existência ou não de diferenças significativas entre os vinhos generosos da colheita de 2015, aguardentados com duas aguardentes vínicas diferentes. O vinho desta colheita foi fortificado com a aguardente A15 e B15 separadamente. Estas duas aguardentes, analiticamente são muito semelhantes (informação disponível em anexo) apesar de o IR ser significativamente diferente.

Quadro 7 – Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015

Parâmetros analíticos	Vinhos Colheita 2015	
	Aguardentes	
	A15	B15
Intensidade da Cor (u.a.)	15,24 ± 3,83 ^a	15,14 ± 3,73 ^a
Cor Vermelha A ₄₂₀ (u.a.)	4,92 ± 0,05 ^a	4,85 ± 0,03 ^a
Cor Vermelha A ₅₂₀ (u.a.)	9,22 ± 0,06 ^a	9,01 ± 0,05 ^a
Cor Vermelha A ₆₂₀ (u.a.)	1,59 ± 0,03 ^a	1,57 ± 0,02 ^a
Tonalidade da Cor (u.a.)	0,730 ± 0,004 ^a	0,538 ± 0,000 ^a
Antocianinas Totais (mg.L ⁻¹)	1191 ± 17,1 ^a	1234 ± 11,5 ^a
Antocianinas. Coradas (mg.L ⁻¹)	98 ± 6,1 ^a	95 ± 1,5 ^a
Índice Ionização (%)	8 ± 0,6 ^a	8 ± 0,0 ^a
Pigmentos Totais (u.a.)	67 ± 0,5 ^a	68 ± 0,4 ^a
Pigmentos Polimerizados (u.a.)	4 ± 0,3 ^a	4 ± 0,1 ^a
Índice de Polimerização (%)	6 ± 0,6 ^a	6 ± 0,0 ^a
Fenóis Totais (mg.L ⁻¹ ác. gálgico)	1162 ± 0,6 ^a	1160 ± 0,6 ^a
Fenóis não-flavonóides (mg.L ⁻¹ ác. gálgico)	120 ± 0,0 ^a	118 ± 0,0 ^a
Fenóis flavonoids (mg.L ⁻¹ ác. gálgico)	1042 ± 0,6 ^a	1041 ± 0,6 ^a
Poder Tanante (NTU.ml ⁻¹)	31,5 ± 7,0 ^a	37,1 ± 13,2 ^a
F1 – flavanóis monoméricos (mg.L ⁻¹)	7,2 ± 0,2 ^a	7,7 ± 0,4 ^a
F2 – proantocianidinas oligoméricas (mg.L ⁻¹)	40,8 ± 2,6 ^a	27,8 ± 8,6 ^a
F3 – proantocianidinas poliméricas (mg.L ⁻¹)	591,2 ± 48,7 ^a	421,0 ± 16,2 ^a

Na mesma linha, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p < ,05$)

Ao analisarmos o quadro 7 verificamos que não existem diferenças significativas em nenhum dos parâmetros entre o vinho fortificado com a aguardente A15 e o vinho fortificado com a aguardente B15, facto que seria de esperar uma vez que estas aguardentes são muito semelhantes apesar de o resultado do IR ter sido bastante distinto.

Para complementar este estudo, houve a necessidade de realizar um novo estudo desta vez com três aguardentes referentes à colheita de 2016.

5.2. Vinhos generosos da colheita de 2016 e comparação com a colheita de 2015

De forma a tentar complementar o estudo anterior, considerou-se relevante realizar um novo estudo, desta vez referente à vindima de 2016. O vinho desta colheita foi fortificado com três aguardentes diferentes, com origens distintas. A aguardente C16 de origem vínica, a aguardente D16 de origem vínica especial e a aguardente E16 de origem vitícola, de acordo com a informação do vendedor.

As análises foram efectuadas aproximadamente 6 meses após a vindima. Os parâmetros analisados já foram descritos anteriormente e o quadro 8 apresenta os resultados obtidos em cada parâmetro depois de ter sido aplicado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes (18 dimensões), com o objectivo de verificar a existência ou não de diferenças significativas entre os vinhos generosos desta colheita.

Quadro 8 – Cor, pigmentos e compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2016

Parâmetros analíticos	Vinhos Colheita 2016		
	Aguardentes		
	C16	D16	E16
Intensidade da Cor (u.a.)	11,17 ± 0,03 ^a	12,16 ± 0,04 ^b	11,33 ± 0,04 ^c
Cor Vermelha A ₄₂₀ (u.a.)	3,69 ± 0,02 ^a	4,00 ± 0,02 ^b	3,76 ± 0,02 ^c
Cor Vermelha A ₅₂₀ (u.a.)	6,09 ± 0,01 ^a	6,65 ± 0,12 ^b	6,19 ± 0,02 ^c
Cor Vermelha A ₆₂₀ (u.a.)	1,38 ± 0,01 ^a	1,51 ± 0,01 ^a	1,38 ± 0,01 ^a
Tonalidade da Cor (u.a.)	0,610 ± 0,002 ^a	0,600 ± 0,002 ^a	0,610 ± 0,001 ^a
Antocianinas Totais (mg.L ⁻¹)	501 ± 4,7 ^a	498 ± 8,2 ^a	495 ± 18,6 ^a
Antocianinas Coradas (mg.L ⁻¹)	65 ± 1,7 ^a	72 ± 0,0 ^b	68 ± 0,6 ^c
Índice Ionização (%)	13 ± 0,0 ^a	15 ± 0,6 ^b	13 ± 0,6 ^a
Pigmentos Totais (u.a.)	30 ± 0,3 ^a	30 ± 0,4 ^a	30 ± 0,6 ^a
Pigmentos Polimerizados (u.a.)	3 ± 0,1 ^a	3 ± 0,0 ^a	3 ± 0,0 ^a
Índice Polimerização (%)	10 ± 0,6 ^a	10 ± 0,0 ^a	10 ± 0,6 ^a
Fenóis Totais (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	1307 ± 0,6 ^a	1383 ± 2,0 ^a	1367 ± 0,6 ^a
Fenóis não-flavonóides (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	163 ± 0,0 ^a	161 ± 0,6 ^a	161 ± 0,0 ^a
Fenóis flavonoides (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	1144 ± 0,6 ^a	1223 ± 2,1 ^a	1206 ± 0,6 ^a
Poder Tanante (NTU.ml ⁻¹)	238,5 ± 3,3 ^a	242,3 ± 15,0 ^a	253,8 ± 19,6 ^a
F1 – flavanóis monoméricos (mg.L ⁻¹)	14,9 ± 4,2 ^a	15,8 ± 1,9 ^a	15,2 ± 4,5 ^a
F2 – proantocianidinas oligoméricas (mg.L ⁻¹)	42,2 ± 7,1 ^a	50,1 ± 9,1 ^a	45,8 ± 1,4 ^a
F3 – proantocianidinas poliméricas (mg.L ⁻¹)	339,9 ± 75,5 ^a	271,0 ± 23,9 ^a	308,1 ± 32,5 ^a

Na mesma linha, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p < ,05$)

Uma vez que as três aguardentes são consideravelmente diferentes, seria de esperar que os três vinhos apresentem diferenças importantes ao nível dos parâmetros analisados. Ao analisarmos o quadro 8 conseguimos perceber que a utilização de diferentes aguardentes induziu a diferenças significativamente importantes ($p < 0,05$) nos seguintes

parâmetros: Intensidade da cor, Cor vermelha A_{420} , Cor vermelha A_{520} , Antocianinas coradas e Índice de ionização, reforçando a importância da composição da aguardente na interação com alguns dos compostos estudados. Todos os outros parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Sendo um dos indicadores mais importantes em enologia, a Intensidade da Cor ou Intensidade Corante esta diretamente relacionada com a cor do produto final. Através do quadro podemos verificar que o a Intensidade da Cor de D16 é superior aos restantes, apesar de serem todos significativamente diferentes ($p < 0,05$). Ao analisarmos as três absorvências (A_{420} , A_{520} e A_{620}) percebemos que a absorvência 520 nm apresenta a maior contribuição para a Intensidade da Cor e estatisticamente apresenta o mesmo resultado que o parâmetro anterior. Por conseguinte, o vinho fortificado com a aguardente D16 que apresenta maior intensidade corante apresenta também maiores teores em proantocianidinas e antocianinas (quadros 5 e 6).

Comparando estes resultados com a percentagem de IR das aguardentes, verifica-se que a aguardente com maior IR induz um aumento da intensidade da cor no respectivo vinho generoso e deveria de induzir uma diminuição nos teores de proantocianidinas de baixo peso molecular e antocianinas monoglucósidas que neste caso não é possível constatar porque apenas foi feita uma análise, relativamente pouco tempo depois da vindima pelo que não é possível avaliar o perfil evolutivo dos vinhos.

Uma vez que existe uma relação direta entre a reatividade da aguardente e o aumento da intensidade da cor, envolvendo os aldeídos, as proantocianidinas e as antocianinas conduzindo à formação de novos pigmentos com consequente alteração e estabilização da cor é de esperar que um aumento na intensidade da cor resulte numa diminuição das antocianinas.

Quanto ao índice de ionização, este parâmetro diz respeito à componente antociânica dos vinhos e traduz a percentagem de antocianinas presentes no vinho na forma corada, (Somers & Evans, 1977). Por exemplo, um vinho que apresente pouca cor pode ser devido a um índice de ionização baixo e não a uma concentração de antocianinas baixa, (Somers & Evans, 1977). Tanto o índice de ionização como as antocianinas coradas apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre D16 e os restantes. Este vinho, fortificado com a aguardente D16 apresenta valores mais elevados para estes dois parâmetros o que pode estar relacionado com o facto de ter sido fortificado com a aguardente com maior IR e daí haver mais antocianinas coradas devido às interações com os aldeídos.

Quanto às antocianinas livres totais, estes compostos são os que contribuem maioritariamente para a cor vermelha dos vinhos, e à medida que o vinho envelhece e a cor estabiliza, as antocianinas vão sofrer processos de copigmentação com outros compostos fenólicos dando origem a pigmentos mais estáveis, pigmentos polimerizados, (Cheynier *et al.*, 2006). Daí ser aceitável os elevados resultados em antocianinas totais e os baixos resultados em pigmentos polimerizados, uma vez que se trata de vinhos jovens. Este aspecto acontece em ambos os ensaios, (quadro 7 e quadro 8).

No poder tanante, apesar de não haver diferenças significativas entre os vinhos ($p>0,05$) é um parâmetro de elevada importância uma vez que permite caracterizar a reactividade dos taninos condensados com as proteínas, (De Freitas & Mateus, 2001). Devido a esta capacidade de reagir com proteínas, os taninos ao entrarem em contacto com as proteínas salivares vão causar a sensação de adstringência (Sarni-Manchado *et al.*, 1999), pois são formados agregados insolúveis que ao precipitarem vão obstruir a lubrificação do palato, causando uma sensação de secura, constrição e rugosidade bucal (Haslam *et al.*, 1981; De Freitas & Mateus, 2001). Tratando-se de vinhos jovens seria de esperar que o poder tanante fosse elevado (aproximadamente 250 NTU.mL⁻¹), uma vez que o índice de grau de polimerização é baixo (10%) e com isto os taninos condensados ficam “disponíveis” para reagir com as proteínas. Ou seja, a elevada polimerização das estruturas de procianidinas que resulta numa maior quantidade de taninos condensados polimerizados quando o índice de polimerização atinge valores superiores a 20% após 8 meses de envelhecimento (Somers & Evans, 1977), traduz uma maior dificuldade de se ligarem às proteínas, ficando menos flexíveis, e daí resultar um menor valor de poder tanante, (Sarni-Manchado *et al.*, 1999).

Curiosamente os vinhos da colheita de 2015, apresentam valores de poder tanante muito baixo (aproximadamente 30 NTU.mL⁻¹, quadro 9) e as aguardentes com que foram fortificados apresentam os teores mais altos de IR (quadro 3) comparativamente com as aguardentes de 2016 que apresentam valores de IR muito reduzidos. Tendo em conta todos os factores que afetaram os dois ensaios, as aguardentes poderão ter um efeito importante ao nível da adstringência dos vinhos generosos.

Ainda no quadro 9 podemos salientar três parâmetros de elevada importância, a intensidade da cor, as antocianinas totais e o poder tanante. No ano de 2015 temos valores muito elevados de antocianinas totais e intensidade corante e contrariamente ao esperado um poder tanante baixo. Comparativamente com o ano de 2016 o valor de antocianinas totais é significativamente mais baixo e curiosamente o valor do poder tanante e da

intensidade corante mais elevados o que nos leva a querer que os taninos estão a influenciar bastante a cor em detrimento das antocianinas.

Os restantes parâmetros não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) e os valores entre os vinhos são muito semelhantes, sem nenhuma particularidade a acrescentar.

Teria sido interessante uma análise evolutiva dos vinhos pelo menos durante o primeiro ano de envelhecimento, porque é durante este tempo que a cor aumenta até ao seu máximo e há um enriquecimento em acetaldeído durante o envelhecimento em madeira devido à oxidação do etanol, de forma a tentar perceber a mudança gradual dos parâmetros responsáveis pela cor dos vinhos.

Quadro 9 – Comparação da cor, pigmentos e dos compostos fenólicos globais dos vinhos generosos da colheita de 2015 e da colheita de 2016

Parâmetros analíticos	Anos	
	2015	2016
Intensidade da Cor (u.a.)	15,19 ± 3,38 ^a	11,56 ± 0,46 ^b
Cor Vermelha A ₄₂₀ (u.a.)	4,89 ± 0,05 ^a	3,82 ± 0,14 ^b
Cor Vermelha A ₅₂₀ (u.a.)	9,12 ± 0,12 ^a	6,31 ± 0,26 ^b
Cor Vermelha A ₆₂₀ (u.a.)	1,58 ± 0,03 ^a	1,43 ± 0,06 ^b
Tonalidade da Cor (u.a.)	0,540 ± 0,004 ^a	0,600 ± 0,002 ^b
Antocianinas Totais (mg.L ⁻¹)	1212 ± 26,8 ^a	498 ± 10,7 ^b
Antocianinas Coradas (mg.L ⁻¹)	97 ± 4,2 ^a	68 ± 3,2 ^b
Índice Ionização (%)	8 ± 0,4 ^a	14 ± 0,9 ^b
Pigmentos Totais (u.a.)	68 ± 0,5 ^a	30 ± 0,3 ^a
Pigmentos Polimerizados (u.a.)	4 ± 0,4 ^a	3 ± 0,0 ^a
Índice Polimerização (%)	6 ± 0,4 ^a	10 ± 0,4 ^b
Fenóis Totais (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	1161 ± 0,6 ^a	1352 ± 1,7 ^b
Fenóis não-flavonóides (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	119 ± 0,0 ^a	162 ± 0,5 ^b
Fenóis flavonoids (mg.L ⁻¹ ác. gálhico)	1042 ± 0,6 ^a	1191 ± 1,1 ^b
Poder Tanante	34,3 ± 9,9 ^a	244,9 ± 14,3 ^b
F1 – flavanóis monoméricos (mg.L ⁻¹)	7,4 ± 0,4 ^a	15,3 ± 0,4 ^a
F2 – proantocianidinas oligoméricas (mg.L ⁻¹)	34,3 ± 9,1 ^a	46,0 ± 4,0 ^a
F3 – proantocianidinas poliméricas (mg.L ⁻¹)	506,1 ± 120,4 ^a	306,3 ± 34,5 ^a
Proantocianidinas de baixo peso molecular (mg.L ⁻¹)	46,8 ± 8,1 ^a	50,9 ± 7,0 ^a
Antocianinas Monoglucósidas (mg.L ⁻¹)	92,5 ± 5,2 ^a	81,9 ± 4,6 ^b

Na mesma linha, letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p < 0,05$).

6. Caracterização sensorial dos vinhos generosos e das aguardentes vónicas

6.1. Análise sensorial das aguardentes

A análise sensorial das aguardentes foi positiva para todas as aguardentes utilizadas neste estudo. No quadro 10 estão representados os resultados idênticos para as cinco aguardentes. Esta informação encontra-se disponível nos certificados de controlo de qualidade de cada aguardente no anexo I.

Quadro 10 – Resultados da análise sensorial das cinco aguardentes em estudo

Ensaio	Resultado
Limpidez	Límpido
Cor	Incolor
Aroma	Sem defeito perceptível
Sabor	Sem defeito perceptível
Defeito	Ausente
Designação	Aguardente própria para Vinho do Porto

Nota: dados fornecidos pela empresa destiladora.

6.2. Análise sensorial dos vinhos generosos da colheita de 2016

A análise sensorial foi realizada por 6 provadores experientes apenas para o vinho da colheita de 2016 explicada no capítulo “Material e métodos” obtendo-se os resultados apresentados nos quadros 11 e 12.

Quadro 11 – Resultado da prova triangular dos vinhos generosos da colheita de 2016

Prova triangular		
Sequência	Respostas	
	Certas	Erradas
1	1	5
2	4	2
3	4	2

Quadro 12 – Resultado da prova de preferência dos vinhos generosos da colheita de 2016

Prova de preferência			
	Aguardente		
	C16	D16	E16
Provador 1	1	2	3
Provador 2	1	3	2
Provador 3	2	1	3
Provador 4	3	1	2
Provador 5	2	3	1
Provador 6	3	2	1
Total	12	12	12

Legenda: 3 – preferido; 2 – intermédio; 1 - preterido

No quadro 11, devido ao número reduzido de provadores não foi possível aplicar um teste de hipóteses. No quadro 12 não existem diferenças estatisticamente significativas na preferência pelas três amostras dado que a pontuação média registada foi de 2 pontos (intermédio).

VI. Conclusão

É de facto sabido que a aguardente vínica e em particular a sua composição em aldeídos desempenha um papel fundamental na transformação dos pigmentos originais do mosto (antocianinas e taninos condensados) originando novos pigmentos com características cromáticas distintas e com repercussões diretas na qualidade do Vinho do Porto no que diz respeito à cor e sabor principalmente nas categorias superiores, em particular no estilo Ruby. É importante perceber que grande parte dos aldeídos são substâncias com odores desagradáveis de grande impacto olfativo, por isso, quantidades elevadas de aldeídos nas aguardentes podem levar a uma depreciação aromática da aguardente e consequentemente do Vinho do Porto. Deste modo, terá que se encontrar um equilíbrio entre um teor de aldeídos na aguardente que cumpra os requisitos legais e que não interfira negativamente na análise sensorial da mesma.

De facto, no estudo realizado para a colheita de 2016, a aguardente com maior IR foi a que apresentou melhores resultados analíticos, com maior intensidade corante, maior teor de antocianinas e maior teor de proantocianidinas de baixo peso molecular em detrimento das restantes aguardentes, apesar de a análise sensorial não ter sido conclusiva nesse sentido.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, é sugerido para trabalhos futuros, um estudo colorimétrico mais aprofundado, uma melhor caracterização dos novos pigmentos formados, uma análise dos aldeídos presentes nas aguardentes mais detalhada, determinação com maior rigor das substâncias que reagem na avaliação do IR e um estudo detalhado ao longo do processo de envelhecimentos do vinho pois a aguardente não é a única fonte de aldeídos e o contacto com a madeira influencia bastante as características do produto final.

Referências Bibliografia

Andrade, R. H. S., do Nascimento, L. S., Pereira, G. E., Hallwass, F., & Paim, A. P. S., (2013). Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. *Microchemical Journal*, **110**: 256–262.

Arnold R. A., Nobel A. C. & Singleton V. L., (1980). Bitterness and Astringency of Phenolic Fractions in Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **28**: 675-678

Bakker J. & Timberlake, C.F. (1986). The mechanism of colour changes in ageing port wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 288–292.

Bakker J. & Timberlake C. F., (1997). Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 35-43

Banquete B. & Trione D., (1998). Les Tannins. In: Actas do 4º simposio de vitivinicultura do Alentejo. Évora, Portugal, **2**: 255-261.

Barros P. & Curvelo-Garcia A. S., (2015). Controlo de qualidade das aguardentes vnicas. In: A. S. Curvelo-Garcia & P. Barros, Química Enológica – métodos analíticos (1ª edição, pp: 709-772). Publindustrias, Edições técnicas.

Belajova, E., (2012). Determination of selected wine phenolic constituents as possible markers for differentiation of wines. *Journal of Food and Nutrition Research*, **51**: 117–122.

Bimpilas A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effects of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, **197**: 39-46.

Boulton R., (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and its Role in the Color of Red Wine. A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**: 67-87.

Brouillard R., (1983). The Invivo Expression of Anthocyanin Color in Plants. *Phytochemistry*, **22**: 1311-1323

Cabezudo, M. D. & Almy, J., (1988). Enrichment of Aldehydes and Ketones in Sherry. *Journal of Food Science*, **53**: 1900.

Carando S., Teissedre P. L. & Cabanis J. C., (1999). Estimation of catechins and procyanidins intake relative to a moderate and regular consumption of wine in France. *Bulletin de l' O.I.V.*, **72**: 72-86.

Cardoso C., Ricardo-da-Silva J. M. & Laureano O., (1997). Influência do teor em compostos voláteis da Aguardente na cor do vinho do Porto. Actas do 3º Encontro de Química de Alimentos, (Alimentação Mediterrânica), Universidade do Algarve, Faro, pp: 79-81.

Carvalho, J. M. P. S., (2005). Influência das aguardentes vínicas na qualidade do Vinho do Porto. Interação dos aldeídos com polifenóis dos vinhos. Tese de Doutoramento em Química. Porto, Departamento de Química da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

Casassa F. & Catania C., (2006). Piranoantocianinas, nuevos pigmentos en los vinos tintos. *Enología*, **3**: 1-23

Castillo-Munoz N., Fernandez-Gonzales M., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E. & Hermosin-Gutierrez I., (2009). Red-color Related Phenolic Composition of Garnache Tintorera (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Red Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57**: 7883-7891

Cheynier V., Duenas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J., Sarni-Manchado P. & Fulceand H., (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57**: 298-305

Cheynier V., Moutounet M. & Sani-Machado P., (1998). Les composés phenoliques. In: Ocnologie. Fondements scientifiques et technologiques, Flanzy C., Ed., Paris, pp: 123-162.

Christoph N. & Bauer-Christoph C., (2007). Flavour of Spirit Drinks : Raw Materials, Fermentation, Distillation and Aging. In : R. G. Berger, Flavours and Fragrances – Chemistry, Bioprocessing and Sustainability (1ª edição, pp : 219-239). Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Clarke R. J. & Bakker J., (2004). Sherry and Port. In: R. J. Clarke & J. Bakker, Wine Flavour Chemistry (1ª edição, pp: 230-264). Blackwell Publishing.

Connadini D. & Nicoletti I., (2013). Changes in Phenolic Compounds. In: F. Mencarelli & P. Tonutti, Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification (1ª edição, pp: 105-118). Wiley-Blackwell

Cozzolino, D., Kwiatkowski, M. J., Parker, M., Cynkar, W. U., Dambergs, R. G., Gishen, M., *et al.*, (2004). Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **513**: 73–80.

Dallas C. & Laureano O., (1994). Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and colored matter of three Portuguese grape varieties during winemaking. *Vitis*, **33**: 41-47

Dallas C., Ricardo-da-Silva J. M. & Laureano O., (1996). Interaction of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin 3-glucoside and acetaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**: 493-500

De Freitas, V., (1995). Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. Thèse de Doctorat en Ampelologie et Oenologie. France, Université de Bordeaux II.

De Freitas, V. & Mateus, N., (2001). Structural features of procyanidin interaction with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 940-945.

Diaz-Garcia, M., Obon, J. M., Castellar, M. R., Collado, J., & Alacid, M., (2013). Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry*, **138**: 938–949.

Fernandes I., Faria A., Azevedo J., Soares S., Calhau C., De Freitas V. & Mateus N., (2010). Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and other Catechol and Pyrogallol – Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **58**: 3785-3792

Fulcrand H., Benabdeljalil C., Rigaud J., Cheynier V. & Moutounet M., (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, **47**: 1401-1407

Garcia F. S. (1891). *O Vinho do Porto*. Dissertação Inaugural, Escola Medico-Cirurgica do Porto, 40-47.

Garrido J. & Borges F., (2013). Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Research International*, **54**: 1844-1858.

Guimarães D. F., (2014). *The secret role of Aguardente*. TONG, nº17 (Port), 27-30.

Haslam E., (1980). In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, **19**: 2577-2582.

Haslam E., McManus J. P., Davis K. G. & Liley T. H., (1981). The association of protein with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication*, **0**: 309-311.

He F., Liang N., Mu L., Pan Q., Wang J., Reeves M. J. & Duan C., (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules*, **17**: 1571-1601.

Hogg T., (2013). Port. In: F. Mencarelli & P. Tonutti, Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification (1ª edição, pp: 305-318). Wiley-Blackwell.

Jackson R. S., (2000). Chemical constituents of grapes and wine. In: R. S. Jackson, Wine Science – Principles, Practices, Perception (2ª edição, pp: 232-280). Elsevier Science & Technology Books.

Jackson R. S., (2008). Chemical constituents of grape and wine. In: R. S. Jackson, Wine Science – Principles and Applications (3ª edição, pp: 270-323). Elsevier Science & Technology Books.

Jurd L. & Somers T. C., (1970). The formation of xanthylum salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry*, **9**: 419-427

Kramling T. E. & Singleton V. L., (1969). Na estimate of the nonflavonoidphenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **20**: 86-92

Macedo, J. B. (1965). Companhias comerciais. In J. Serrão (dir.), *Dicionário de História de*

Portugal. (Vol. I: pp. 636-644). Lisboa: Iniciativas Editoriais.

Marquez A., Serratosa M. P. & Merida J., (2013). Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking. ID 713028, *Journal of Chemistry*, **2013**: 1-15.

Martelo-Vidal M.J. & Vásquez M., (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wine by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, **1581**: 28-34.

Martins, C. A. (1988). Os ciclos do vinho do Porto: ensaio de periodização. *Análise Social*, **XXIV** (100): 391-429.

Masquellier J., (1988). Physiological effects of wine. His share in alcoholism, *Bulletin de l' O.I.V.*, **61**: 554-578.

Mateus N. & Freitas V., (2001). Evolution and Stability of Anthocyanin – Derived Pigments during Port Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 5217-5222

Mateus N, Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J., Santos-Buelga C. & De Freitas V., (2002). Structural diversity of anthocyanin – derived pigment in port wine. *Food Chemistry*, **76**: 335-342

Mateus N., Silva A. M. S., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. & De Freitas V., (2003). A new class of blue anthocyanin derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 1919-1923

Mateus N., Oliveira J., Santos-Buelga C., Silva A. M. S. & De Freitas V., (2004). NMR structures characterization of a new vinylpyranoanthocyanin – catechin pigments. *Tetrahedron Letters*, **45**: 3455-3457

Monagas M. & Bartolomé B., (2009). Anthocyanins and Anthocyanin – Derived compounds. In: M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry* (1ª edição, pp: 439-462). Springer Science + Business Media, LLC.

Morata A., Gómez-Cordovés M. C., Colomo B. & Suárez J. A., (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

51: 7403-7409.

Morata A., Calderon F., González M. C., Gómez-Cordovés C. & Suárez J. A., (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisin A and B) in red wine by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chemistry*, **100**: 1144-1152

Oliveira J., De Freitas V., Silva A. M. S. & Mateus N., (2007). Reaction between Hydroxycinnamic Acids and Anthocyanin-Pyruvic Acids Adducts Yielding New Portisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 6349-6356

Pissarra J., Mateus N., Rivas-Gonzalo J., Santos-Buelga C & De Freitas V., (2003). Reaction between Malvidin 3-glucosido and (+)-catequin in Model Solutions Containing Different Aldehydes. *Food Chemistry and Toxicology*, Vol. 68, Nr. 2, pp: 476-481

Pissara J., Lourenço S., Machado J. M., Mateus N., Guimaraens D. & De-Freitas V., (2005). Contribution and importance of wine spirits to the port wine final quality – initial approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**: 1091-1097

Porter L. J., (1988). Flavans and Proanthocyanidins. In: J. B. Harborne, The flavonoids advances in research since 1980 (1ª edição, pp: 21-62). Springer US

Reader H. P. & Dominguez M., (2003). Fortified wines: sherry, port and madeira. In: A. G. H. Lea & J. R. Piggott, Fermented Beverage Production (2ª edição, pp: 157-194). Springer US

Ribéreau-Gayon P., (1970). La dosage des composes phenolique totaux das les vins rouge. *Chimie Analytique*, **52**: 627-631

Ribéreau-Gayon P., Pontallier P. & Glories Y., (1983). Some Interpretations of Colour Changes in Young Red Wines During Their Conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**: 505-516

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. & Dubourdier D., (2006). Phenolic compounds. In: P. Ribéreau-Gayon, et al., Handbook of enology, Volume 2 – The chemistry of wine stabilization and treatments (2ª edição, pp: 141-203). John Wiley & Sons, Ltd.

Ricardo-da-Silva J.M., Rosec J. P., Bourzeix M. & Heredita N., (1990). Separation and quantitative determination of grapes and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **53**: 85-92

Ricardo-da-Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y. & Mitjavila S., (1991a). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of diferente procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**: 1549-1552.

Ricardo-da-Silva J.M., Rosec J.Ph., Bourzeix M., Mourges J. & Moutouret M., (1991b). Procyanidins dimers and trimmers from grape seeds. *Phytochemistry*, **30**: 1259-1264

Rigaud J., Pérez-Ilzarbe J., Ricardo-da-Silva J.M. & Cheynier V., (1991). Micro method for the identification of proanthocyanidins using thiolysis monitored by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **540**: 401-405

Rivas-Gonzalo J. C., Bravo-Haro S. & Santos-Buelga C., (1995). Detection of compound formed through the reaction of malvidine-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **43**: 1444-1449

Rogerson F. S. S. & Freitas V. A. P., (2002). Fortification Spirit, a Contributor to the Aroma Complexity of Port. *Journal of Food Science*, **67**: 1564-1569

Romero C. & Bakker J., (1999). Interactions between Grape Anthocyanins and Pyruvic Acid, with Effect of pH and Acid Concentration on Anthocyanin Composition and color in Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 3130-3139.

Romero C. & Bakker J., (2001). Anthocyanin and color evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**: 252-260

Santos-Buelga C. & Scalbert S., (2000). Proanthocyanidins and tannin – like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1094-1117

Sarni-Manchado P., Delenis A., Avallone S., Cheynier V. & Moutounet M., (1999). Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**: 81-86

Somers T. C., (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, **10**: 2175-2186

Somers T. C. & Evans M. E., (1997). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **28**: 279-287

Spranger M.I., Mateus A.M. & Sun B.S., (2002). In vitro studies on the antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fraction from grape seeds. In: *Polyphenols Communication 2002* El Hadrami, I. Ed., Groupe Polyphenols, Marrakech, Morocco, 229-230.

Sudraud P., (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annales de technologie agricole*, **7**: 203-208.

Sun B., Leandro, C., Ricardo da Silva J.M. & Spranger I., (1998a). Separation of grapes and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**: 1390-1396.

Sun B., Ricardo da Silva J.M. & Spranger I., (1998b). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4267-4274.

Sun B. & Spranger M. I., (2015). Polifenóis da uva e do vinho – Importância em enologia e efeito benéfico para a saúde humana. In: A. S. Curvelo-Garcia & P. Barros, Química Enológica – Métodos analíticos (1ª edição, pp: 181-220). Publindústrias, Edições técnicas.

Timberlake C.F. & Bridle P., (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **27**: 97-105.

Vanderlinde R., (1995). Etude de certains caractères des eaux-de-vin. Rôle des composés carbonyles. Thèse pour le Doctorat. Université de Bordeaux II, France

Vivas N., Glories Y., Lagune L., Saucier C. & Augustin M., (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-

dimethylsminocinnamaldedéhyde. *Journal International des Sciences de la Vignes et du Vin*, **28**: 319-336

Cibergrafia:

Cipriano J. (2015). *Como se produz vinho – Produção e fermentação, linhas gerais*.

Disponível em:

<https://www.clubevinhosportugueses.pt/vinhos/como-se-produz-vinho-producao-e-fermentacao-linhas-gerais-3/>

(acedido em 17 de Janeiro de 2018)

História do Vinho do Porto. (2013). Porto: Porto Taylor's. Disponível em:

<http://www.taylor.pt/pt/o-que-e-o-vinho-do-porto/introducao-ao-vinho-do-porto/>

(acedido em 22 de Janeiro de 2018)

Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (2004). *Vinhos do Porto – Cor*. Disponível em:

<https://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=65>

(acedido em 22 de Janeiro de 2018)

Anexos

Anexo 1 – Ficha de Prova – Teste Triangular

FICHA DE PROVA – TESTE TRIANGULAR

Prova #1 – “AD – lote de vinho fortificado com 3 AD distintas”

Nome: CHAVE DA PROVA

Prove da sequência 1, 2 e 3.

Assinale a amostra diferente com o símbolo (+), caso a amostra seja de melhor qualidade que as restantes; ou com o símbolo (-), caso a amostra seja de pior qualidade que as restantes. Não deixe de fazer a escolha em ambas as sequências.

No quadro da direita, assinale com um x os parâmetros que influenciaram a sua decisão na escolha da amostra considerada diferente.

Sequência	536	457	404		Comentários
Sequência 1				<input type="checkbox"/> Visual <input type="checkbox"/> Olfactivo <input type="checkbox"/> Gustativo	
	A	A	B		
Sequência 2				<input type="checkbox"/> Visual <input type="checkbox"/> Olfactivo <input type="checkbox"/> Gustativo	
	B	D	C		
Sequência 3				<input type="checkbox"/> Visual <input type="checkbox"/> Olfactivo <input type="checkbox"/> Gustativo	
	A	B	C		
Sequência 4				<input type="checkbox"/> Visual <input type="checkbox"/> Olfactivo <input type="checkbox"/> Gustativo	
	A	B	C		

Coloque por ordem de preferência de 1 a 3, onde 1 é o melhor pontuado e 3 o pior pontuado.

Anexo 2 – Certificado de controlo de qualidade da aguardente A15




 Emitido em: 2015-08-24 14:31:52 (Versão 1)

N.º Processo: 2015/02768/01 Data Receção: 2015/08/10 V.Ref.: INOX 30563 Lote: -

Página 1 de 2

**** CERTIFICADO DE CONTROLO DA QUALIDADE ****
 Produto: 03 Aguardente Finalidade: 08 Registo de Aguardente
 N.º Registo: 00000 Cat. Produto: DO Porto - Aguardente para beneficiação e lotação

Entidade: 5017469030 SOC. AGRIC. NOGUEIRA, LDA.
 QUINTA DA ROLHA / APARTADO 7
 Apartado 7
 5085-036 PINHÃO - PORTUGAL

Designações

Ano/Idade: - Tipo: - Doçura: -

Resultados de Análise Laboratorial

N.º	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
33 2	Carbamatos de Estilo	<LO	50 µg/dm³	MIWDP56-05	2015/08/17
74 2	Título Alcoométr. Vol.Bruto	77,10	% vol. (20°C)	OIV-B8-06	2015/08/11
75 1	Acidez Total - AD	114	mg (ác.acético)/dm³alc.100%	OIV-B9-12	2015/08/11
76 1	Alcoois Superiores Totais	270	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
77 1	Etanal	<LO	8 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
78 1	Acetato de Estilo	24	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
79 1	Metanol	70	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
80 1	2-Butanol	0,8	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
81 1	1-Propanol	31	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
82 1	Isobutanol	46	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
83 1	Alcool Alílico	0,5	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
84 1	1-Butanol	1,0	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
85 1	Alcoois Anfílicos	190	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
86 1	Ácido Cianídrico	<LO	0,08 mg/dm³	MIWDP50-01 *	2015/08/13
87 1	Relação 13C/12C	-26,2	o/oo		2015/08/19
88 1	Razão Isotópica (D/H) 1	104,1	p.p.m.		2015/08/19
89 1	Acidez Volátil - AD	109	mg (ác.acético)/dm³alc.100%	OIV-B8-12	2015/08/11
90 1	Acidez Fixa - AD	5	mg (ác.acético)/dm³alc.100%	OIV-B8-12	2015/08/11
93 1	Resíduo (Reg. AD's)	1	1-típico/0-não típico	MIWDP53-01 *	2015/08/11
96 1	Rel.1-Propanol/Isobutanol	0,7		MIWDP55-09	2015/08/14
97 1	Rel.Álc.Amílico/Isobutanol	4,2		MIWDP55-09	2015/08/14
98 1	Cálcio (Ca) - AD	<LO	0,2 mg/dm³	MIWDP08-10	2015/08/24
99 1	Cobre (Cu) - AD	<LO	0,05 mg/dm³	MIWDP09-10	2015/08/24
100 1	Ferro (Fe) - AD	<LO	0,10 mg/dm³	MIWDP10-11	2015/08/24
147 1	Massa Volúmica - AD	0,86721	g/cm³	OIV-B8-06	2015/08/11
185 1	2-Metil-1-Butanol	34,7	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14
186 1	3-Metil-1-Butanol	155,8	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/08/14

Resultados de Análise Sensorial

Cod	Característica	Cod	Resultado	Método	Data
01	Limpidez	01	Límpido	MIWDP101-1-10	2015/08/11
02	Cor	02	Incolor	MIWDP101-2-10	2015/08/11
04	Aroma	02	Sen defeito perceptível	MIWDP101-3-10	2015/08/11
05	Sabor	02	Sen defeito perceptível	MIWDP101-4-10	2015/08/11
06	Defeito	02	Ausente	MIWDP101-5-10	2015/08/11
10	Designação	02	Corresponde a AD própria para V.	MIWDP101-10-3	2015/08/11

Apreciações

Aprec.Laboratorial: Análise físico-química NORMAL, relativamente aos parâmetros determinados.

Apreciação Prova: Apresenta as características organolépticas previstas no Regulamento de Aguardentes.

Anexo 3 – Certificado de controlo de qualidade da aguardente B15

GOVERNO DE PORTUGAL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
IVOP
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P.
IFAC
Emissão: 2015-06-11 14:54:22 (Versão 1)
Nº Processo: 2015/01855/01 Data Receção: 2015/05/18 V.Ref.: CIMENTO 61098
Lote: -
Página 1 de 2

**** CERTIFICADO DE CONTROLO DA QUALIDADE ****
Produto: 03 Aguardente Finalidade: 08 Registo de Aguardente
Nº Registo: 00000 Cat. Produto: DO Porto - Aguardente para beneficiação e lotação

Entidade: 5017468030 SOC. AGRÍC. NOGUEIRA, LDA.
QUINTA DA ROEDA / APARTADO 7
Apartado 7
5085-036 PINHÃO - PORTUGAL

Designações

Ano/Idade: - Tipo: Doçura:

Resultados de Análise Laboratorial

Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
33 2	Carbonato de Etilo	<LQ	50 µg/dm³	MIWDP56-05	2015/05/21
74 2	Título Alcoométr. Vol.Bruto	77,01	% vol. (20°C)	OIV-B8-06	2015/05/19
75 1	Acidez Total - AD	96	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2015/05/21
76 1	Alcoois Superiores Totais	264	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
77 1	Etanal	<LQ	8 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
78 1	Acetato de Etilo	27	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
79 1	Metanol	70	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
80 1	2-Butanol	0,9	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
81 1	1-Propanol	32	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
82 1	Isobutanol	44	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
83 1	Alcool Alílico	0,4	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
84 1	1-Butanol	1,2	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
85 1	Alcoois Anfílicos	186	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
86 1	Ácido Cianídrico	0,09	mg/dm³	MIWDP50-01	2015/06/02
87 1	Relação 13C/12C	-26,1	o/oo		2015/06/05
88 1	Razão Isotópica (D/H) 1	103,8	p.p.m.		2015/06/05
89 1	Acidez Volátil - AD	88	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2015/05/21
90 1	Acidez Fixa - AD	8	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2015/05/21
93 1	Resíduo (Reg. AD's)	1	1-típico/0-não típico	MIWDP53-01	2015/05/19
96 1	Rel.1-Propanol/Isobutanol	0,7		MIWDP55-09	2015/05/22
97 1	Rel.Álc.Amfílicos/Isobutanol	4,2		MIWDP55-09	2015/05/22
98 1	Calcio (Ca) - AD	<LQ	0,2 mg/dm³	MIWDP08-10	2015/05/22
99 1	Cobre (Cu) - AD	<LQ	0,05 mg/dm³	MIWDP09-10	2015/05/22
100 1	Ferro (Fe) - AD	<LQ	0,10 mg/dm³	MIWDP10-11	2015/05/22
147 1	Massa Volúmica - AD	0,86746	g/cm³	OIV-B8-06	2015/05/19
185 1	2-Metil-1-Butanol	34	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22
186 1	3-Metil-1-Butanol	152	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2015/05/22

Resultados de Análise Sensorial


Cod	Característica	Cod	Resultado	Método	Data
01	Límpido	01	Límpido	MIWDP101-1-10	2015/05/20
02	Cor	09	Incolor	MIWDP101-2-10	2015/05/20
04	Aroma	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-3-10	2015/05/20
05	Sabor	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-4-10	2015/05/20
06	Defeito	99	Ausente	MIWDP101-5-10	2015/05/20
10	Designação	09	Corresponde a AD própria para V.	MIWDP101-10-3	2015/05/20

Apreciações

Aprec.Laboratorial: Análise físico-química NORMAL, relativamente aos parâmetros determinados.


Apreciação Prova: Apresenta as características organolépticas previstas no

Anexo 4 – Certificado de controlo de qualidade da aguardente C16



REPÚBLICA
PORTUGUESA

ACÓLITO, TITULO, E PREÇOS
E DESIGNAÇÃO DE PRODUTOS



Emitido em: 2016-07-06 07:54:49 (Versão 1)

António Amaral

Nº Processo: 2016/01921/01 Data Recepção: 2016/06/16 V.Ref.: IMOX G-08

Lote: -

Página 1 de 2

CERTIFICADO DE CONTROLO DA QUALIDADE

Produto: 03 Aguardente Finalidade: 08 Registo de Aguardente
 Nº Registo: 00000 Validade do registo: - Cat. Produto: DO Porto - Aguardente para beneficiação e lotação

Entidade: 9999943277 GENERAL DESTILACIONES, S.A.
 13600 ALCÁZAR SAN JUAN
 AV DE LOS VINGOS, 12 - PARCELA 803 (CIUDAD REAL)
 11 ESPANHA - PORTUGAL

CoP. 10/4280 ADTos/Vin'ale C16

Designações

Ano/Idade: - Tipo: Doçura:

Resultados de Análise Laboratorial

Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
33 2	Carbonato de Etilo	<LQ	50 µg/dm³	MIWDP56-05	2016/06/20
74 2	Título Alcoométr. Vol.Bruto	77,13	% vol. (20°C)	OIV-B8-06	2016/06/17
75 1	Acidez Total - AD	54	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
76 1	Alcoois Superiores Totais	243	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
77 1	Etanal	<LQ	9 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
78 1	Acetato de Etilo	17	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
79 1	Metanol	70	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
80 1	2-Butanol	<LQ	0,7 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
81 1	1-Propanol	33	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
82 1	Isobutanol	44	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
83 1	Álcool Alílico	0,6	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
84 1	1-Butanol	1,0	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
85 1	Alcoois Anfílicos	164	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
86 1	Ácido Cianídrico	<LQ	0,08 mg/dm³	MIWDP50-01	* 2016/06/23
87 1	Relação 13C/12C	-26,7	o/oo		@ 2016/06/28
88 1	Razão Isotópica (D/H) 1	105,1	p.p.m.		@ 2016/06/28
89 1	Acidez Volátil - AD	49	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
90 1	Acidez Fixa - AD	5	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
93 1	Resíduo (Reg* AD's)	1	l-típico/0=não típico	MIWDP53-01	* 2016/06/17
96 1	Rel.1-Propanol/Isobutanol	0,8		MIWDP55-09	2016/06/23
97 1	Rel.Álc.Amílico/Isobutanol	3,7		MIWDP55-09	2016/06/23
98 1	Cálcio (Ca) - AD	<LQ	0,2 mg/dm³	MIWDP08-10	2016/06/23
99 1	Cobre (Cu) - AD	<LQ	0,05 mg/dm³	MIWDP09-10	2016/06/23
100 1	Ferro (Fe) - AD	<LQ	0,10 mg/dm³	MIWDP10-11	2016/06/23
147 1	Massa Volúmica - AD	0,86714	g/cm³	OIV-B8-06	2016/06/17
185 1	2-Metil-1-Butanol	31,1	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
186 1	3-Metil-1-Butanol	132,4	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23

Resultados de Análise Sensorial


Cod	Característica	Cod	Resultado	Método	Data
01	Limpidez	01	Límpido	MIWDP101-1-10	2016/06/17
02	Cor	02	Incolor	MIWDP101-2-10	2016/06/17
04	Aroma	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-3-10	2016/06/17
05	Sabor	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-4-10	2016/06/17
06	Defeito	99	Ausente	MIWDP101-5-10	2016/06/17
10	Designação	09	Corresponde a AD própria para V.	MIWDP101-10-3	2016/06/17

Apreciações

Aprec.Laboratorial: Análise físico-química NORMAL, relativamente aos parâmetros determinados.


Apreciação Prova: Apresenta as características organolépticas previstas no Regulamento de Aguardentes.

Anexo 5 – Certificado de controlo de qualidade da aguardente D16



REPÚBLICA PORTUGUESA

ACÓLITO, TITULO, E PROVAS
E DESIGNAÇÃO DE PRODUTO



Emitido em: 2016-07-06 07:54:49 (Versão 1)

António Amaral

Nº Processo: 2016/01921/01 Data Recepção: 2016/06/16 V.Ref.: IMOX G-08 Lote: -

Página 1 de 2

CERTIFICADO DE CONTROLO DA QUALIDADE

Produto: 03 Aguardente Finalidade: 08 Registo de Aguardente
 Nº Registo: 00000 Validade do registo: - Cat. Produto: DO Porto - Aguardente para beneficiação e lotação

Entidade: 9999943277 GENERAL DESTILACIONES, S.A.
 13600 ALCÁZAR SAN JUAN
 AV DE LOS VINGOS, 12 - PARCELA 803 (CIUDAD REAL)
 11 ESPANHA - PORTUGAL

CTP. 10/4280 ADTos/Vin'ale 156

Designações

Ano/Idade: - Tipo: Doçura:

Resultados de Análise Laboratorial

Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
33 2	Carbonato de Etilo	<LQ	50 µg/dm³	MIWDP56-05	2016/06/20
74 2	Título Alcoométr. Vol.Bruto	77,13	% vol. (20°C)	OIV-B8-06	2016/06/17
75 1	Acidez Total - AD	54	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
76 1	Alcoois Superiores Totais	243	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
77 1	Etanal	<LQ	9 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
78 1	Acetato de Etilo	17	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
79 1	Metanol	70	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
80 1	2-Butanol	<LQ	0,7 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
81 1	1-Propanol	33	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
82 1	Isobutanol	44	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
83 1	Álcool Alílico	0,6	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
84 1	1-Butanol	1,0	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
85 1	Alcoois Anfílicos	164	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
86 1	Ácido Cianídrico	<LQ	0,08 mg/dm³	MIWDP50-01	* 2016/06/23
87 1	Relação 13C/12C	-26,7	o/oo		@ 2016/06/28
88 1	Razão Isotópica (D/H) 1	105,1	p.p.m.		@ 2016/06/28
89 1	Acidez Volátil - AD	49	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
90 1	Acidez Fixa - AD	5	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
93 1	Resíduo (Reg* AD's)	1	l-típico/0=não típico	MIWDP53-01	* 2016/06/17
96 1	Rel.1-Propanol/Isobutanol	0,8		MIWDP55-09	2016/06/23
97 1	Rel.Álc.Amílico/Isobutanol	3,7		MIWDP55-09	2016/06/23
98 1	Cálcio (Ca) - AD	<LQ	0,2 mg/dm³	MIWDP08-10	2016/06/23
99 1	Cobre (Cu) - AD	<LQ	0,05 mg/dm³	MIWDP09-10	2016/06/23
100 1	Ferro (Fe) - AD	<LQ	0,10 mg/dm³	MIWDP10-11	2016/06/23
147 1	Massa Volúmica - AD	0,86714	g/cm³	OIV-B8-06	2016/06/17
185 1	2-Metil-1-Butanol	31,1	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
186 1	3-Metil-1-Butanol	132,4	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23

Resultados de Análise Sensorial


Cod	Característica	Cod	Resultado	Método	Data
01	Limpidez	01	Límpido	MIWDP101-1-10	2016/06/17
02	Cor	02	Incolor	MIWDP101-2-10	2016/06/17
04	Aroma	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-3-10	2016/06/17
05	Sabor	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-4-10	2016/06/17
06	Defeito	99	Ausente	MIWDP101-5-10	2016/06/17
10	Designação	09	Corresponde a AD própria para V.	MIWDP101-10-3	2016/06/17

Apreciações

Aprec.Laboratorial: Análise físico-química NORMAL, relativamente aos parâmetros determinados.


Apreciação Prova: Apresenta as características organolépticas previstas no Regulamento de Aguardentes.

Anexo 6 – Certificado de controlo de qualidade da aguardente E16



REPÚBLICA PORTUGUESA

ACÓLITO, TITULO, E PROVAS
E DESIGNAÇÃO DE PRODUTO



Emitido em: 2016-07-06 07:54:49 (Versão 1)

António Amaral

Nº Processo: 2016/01921/01 Data Recepção: 2016/06/16 V.Ref.: IMOX G-08 Lote: -

Página 1 de 2

******* CERTIFICADO DE CONTROLO DA QUALIDADE *******

Produto: 03 Aguardente Finalidade: 08 Registo de Aguardente
 Nº Registo: 00000 Validade do registo: - Cat. Produto: DO Porto - Aguardente para beneficiação e lotação

Entidade: 9999943277 GENERAL DESTILACIONES, S.A.
 13600 ALCÁZAR SAN JUAN
 AV DE LOS VINGOS, 12 - PARCELA 803 (CIUDAD REAL)
 11 ESPANHA - PORTUGAL

C.P. 10/4280 ADTos/Vin'ale 156

Designações

Ano/Idade: - Tipo: Doçura:

Resultados de Análise Laboratorial

Cod	Designação do Parâmetro	Resultado	Unidade	Método	Data
33 2	Carbonato de Etilo	<LQ	50 µg/dm³	MIWDP56-05	2016/06/20
74 2	Título Alcoométr. Vol.Bruto	77,13	% vol. (20°C)	OIV-B8-06	2016/06/17
75 1	Acidez Total - AD	54	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
76 1	Alcoois Superiores Totais	243	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
77 1	Etenal	<LQ	9 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
78 1	Acetato de Etilo	17	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
79 1	Metanol	70	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
80 1	2-Butanol	<LQ	0,7 mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
81 1	1-Propanol	33	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
82 1	Isobutanol	44	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
83 1	Álcool Alílico	0,6	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
84 1	1-Butanol	1,0	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
85 1	Alcoois Anfílicos	164	mg/100 cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
86 1	Ácido Cianídrico	<LQ	0,08 mg/dm³	MIWDP50-01	* 2016/06/23
87 1	Relação 13C/12C	-26,7	o/oo		@ 2016/06/28
88 1	Razão Isotópica (D/H) 1	105,1	p.p.m.		@ 2016/06/28
89 1	Acidez Volátil - AD	49	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
90 1	Acidez Fixa - AD	5	mg (ác.acético)/dm³alc.100%v	OIV-B8-12	2016/06/22
93 1	Resíduo (Reg* AD's)	1	l-típico/0=não típico	MIWDP53-01	* 2016/06/17
96 1	Rel.1-Propanol/Isobutanol	0,8		MIWDP55-09	2016/06/23
97 1	Rel.Álc.Amílico/Isobutanol	3,7		MIWDP55-09	2016/06/23
98 1	Cálcio (Ca) - AD	<LQ	0,2 mg/dm³	MIWDP08-10	2016/06/23
99 1	Cobre (Cu) - AD	<LQ	0,05 mg/dm³	MIWDP09-10	2016/06/23
100 1	Ferro (Fe) - AD	<LQ	0,10 mg/dm³	MIWDP10-11	2016/06/23
147 1	Massa Volúmica - AD	0,86714	g/cm³	OIV-B8-06	2016/06/17
185 1	2-Metil-1-Butanol	31,1	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23
186 1	3-Metil-1-Butanol	132,4	mg/100cm³ alc. 100% vol.	MIWDP55-09	2016/06/23

Resultados de Análise Sensorial

Cod	Característica	Cod	Resultado	Método	Data
01	Limpidez	01	Límpido	MIWDP101-1-10	2016/06/17
02	Cor	02	Incolor	MIWDP101-2-10	2016/06/17
04	Aroma	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-3-10	2016/06/17
05	Sabor	02	Sem defeito perceptível	MIWDP101-4-10	2016/06/17
06	Defeito	99	Ausente	MIWDP101-5-10	2016/06/17
10	Designação	09	Corresponde a AD própria para V.	MIWDP101-10-3	2016/06/17

Apreciações

Aprec.Laboratorial: Análise físico-química NORMAL, relativamente aos parâmetros determinados.

Apreciação Prova: Apresenta as características organolépticas previstas no Regulamento de Aguardentes.